

Produktion hochwertiger Oligosaccharide aus nachwachsenden Rohstoffen

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Martina Anja Zwerenz
aus Meerane

1. Referent:	apl. Professor Dr. Hans-Joachim Jördening
2. Referent:	apl. Professor Dr. Siegmund Lang
eingereicht am:	23.12.2011
mündliche Prüfung (Disputation) am:	18.04.2012

Druckjahr 2012

I. Publikationen

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Zwerenz, M.A., Jördening, H.-J. (2010) Technisches Verfahren zur Gewinnung von Oligosacchariden; Chemie Ingenieur Technik 82(9): 1490

Tagungsbeiträge

Moszyk, M.A., Jördening, H.-J. (2009) Novel acceptors as substrate for the fructosyltransferase of *Bacillus megaterium* for production of new fructooligosaccharides; (Poster), Symposium des FAEN im Rahmen des „Netzwerk Lebensmittel“ mit dem Thema: Lebensmittel und Gesundheit – Können blaue Kartoffeln vor Krebs schützen und Brot den Cholesterolspiegel senken?, Hannover

Moszyk, M.A., Jördening, H.-J. (2009) Novel acceptors as substrate for the fructosyltransferase of *Bacillus megaterium* for production of new fructooligosaccharides; (Poster), 8th Carbohydrate Bioengineering Meeting (CBM8), Ischia, Neapel, Italien

Zwerenz, M.A., Jördening, H.-J. (2009) Technisches Verfahren zur Gewinnung hochwertiger Oligosaccharide für Ernährung und Pharmazie aus Saccharose; (Vortrag), Projektmeeting des FAEN im Rahmen des Verbundprojektes „Netzwerk Lebensmittel“, Quakenbrück

Zwerenz, M.A., Jördening, H.-J. (2010) Technisches Verfahren zur Gewinnung von Oligosacchariden; (Vortrag), ProcessNet-Jahrestagung und 28. Jahrestagung der Biotechnologen, Aachen

Zwerenz, M.A., Jördening, H.-J. (2011) Immobilized fructosyltransferase from *Bacillus megaterium* for continuous production of novel fructooligosaccharides; (Poster), 9th Carbohydrate Bioengineering Meeting (CBM9), Lissabon, Portugal

II. Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Technische Chemie, Abteilung Technologie der Kohlenhydrate der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig im Zeitraum von Februar 2008 bis Dezember 2011.

Mein erster und besonderer Dank gebührt Herrn apl. Prof. Dr. Hans-Joachim Jördening für die mir gebotene Möglichkeit in seinem Arbeitskreis zu promovieren sowie für die fachliche Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit und vor allem für das mir entgegengebrachte Vertrauen. Die Möglichkeit zur Mitarbeit im EU-TEMPUS Projekt mit der University of Assiut (Ägypten) war darüber hinaus eine große Bereicherung für mich.

Herrn apl. Prof. Dr. Siegmund Lang danke ich für die freundliche Übernahme des Co-Referates und dafür, dass er ein immer zu erreichender und helfender Ansprechpartner ist.

Ein weiterer Dank gilt Herrn apl. Prof. Dr. Rainer Krull für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Ebenso bin ich meinen Arbeitskollegen und -kolleginnen aus dem Biozentrum und dem Institut für Technische Chemie für die gute Zusammenarbeit, das schöne Arbeitsklima und gemeinsame Unternehmungen dankbar. Es hat Spaß gemacht, mit Euch allen zu arbeiten.

Ein weiterer besonderer Dank gilt Herrn Rolf Harrendorf, der mit seinen „goldenen Händen“ einen riesigen Anteil am Gelingen der Instandsetzung des neuen Labors hatte.

Für die Anfertigung von Studien-, Diplom- und Masterarbeiten, die direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich mich bei (in alphabetischer Reihenfolge): Pablo Albiero, Thibault Godard, ebenso wie bei meinen studentischen Hilfskräften Jessica Bellmann, Lars Freund, Katrin Grothus und Maria Mensch bedanken.

Für interessante Gespräche, moralische und anderweitige Unterstützung bedanke ich mich besonders bei (in alphabetischer Reihenfolge): Rafael Beine, Dirk Eiting, Frank Erhardt, Wolfgang Graßl, Sven Götze, Lars Hillringhaus, Sven Höbbel, Andrea und Manuel Holtkamp, Ingo Kampen, Linda Kilian, Stefanie Michels, Anita Scherbarth, Gabi Schirmer, Bodo

Schmalbruch, Ariane Schwoerer, Verena Recke, Malte Timm, Manuela Vielkind, Julika Wrenger und Marwan Zein.

Die finanzielle Förderung der Arbeit durch das Niedersächsische Ministerium für Wissenschaft und Kultur im Rahmen des Forschungsverbund Agrar- und Ernährungswissenschaften Niedersachsen „Netzwerk Lebensmittel“ (FAEN) sei an dieser Stelle anerkennend erwähnt.

Annett Narloch, Christine Zwerenz-Prüstel und meinem Mann Kay Zwerenz danke ich für die Korrekturlesung dieser Arbeit.

Dank gilt auch meiner Familie, die mich während meiner Studienjahre in allen Belangen unterstützt und vieles erst möglich gemacht hat.

Und schließlich meinem lieben Mann Kay, für seine Liebe, Geduld und Unterstützung, die ich in der ganzen Zeit erfahren durfte.

Braunschweig, Dezember 2011

I.	Publikationen	i
II.	Danksagung	ii
III.	Inhaltsverzeichnis.....	iv
1	Einleitung	1
2	Theoretische Grundlagen	3
2.1	Oligosaccharide	4
2.1.1	Physiologische Effekte neuer Oligosaccharide	4
2.1.1.1	Einsatzmöglichkeiten von Oligo- und Polysacchariden	4
2.1.1.2	FOS als Präbiotika.....	5
2.2	Glycosyltransferasen	6
2.2.1	Leloir-Transferasen.....	7
2.2.2	Non-Leloir-Transferasen	7
2.3	Fructosyltransferase: Struktur, Reaktionsmechanismus und FOS Synthese	8
2.3.1	Struktur und Substratreaktion mikrobieller Fructosyltransferasen	8
2.3.2	Akzeptorreaktion der Fructosyltransferase und FOS Synthese	10
2.4	Bestimmung der kinetischen Parameter einer Enzymreaktion.....	12
2.4.1	Ein-Substrat-Kinetik	12
2.4.2	Zwei-Substrat-Kinetik.....	14
2.4.3	Beeinflussung der Enzymkinetik durch verschiedene Faktoren.....	15
2.4.3.1	pH-Einfluss auf die Enzymreaktion	16
2.4.3.2	Temperatur-Abhängigkeit der Enzymreaktion	16
2.4.3.3	Inhibierungsmechanismen	17
2.5	Immobilisierung von Enzymen	18
2.5.1	Adsorption	20
2.5.2	Matrixeinhüllung	21
2.6	Downstream-Processing.....	24
2.6.1	Chromatographie	25
2.6.1.1	Trennprinzipien der Chromatographie.....	25
2.6.1.2	Kenngrößen der Säulenchromatographie	27
2.6.2	Zeolithe.....	30

3	Zielsetzung der Arbeit	32
4	Material und Methoden.....	34
4.1	Chemikalien und Geräte.....	34
4.1.1	Chemikalien.....	34
4.1.2	Geräte	34
4.2	Mikro- und makromolekulare Grundlagen	36
4.2.1	Bakterienstämme.....	36
4.2.2	Bakterielle Plasmide	36
4.2.3	Stamm zur Herstellung der rekombinanten Fructosyltransferase	36
4.3	Medien und Medienzusätze	38
4.3.1	Luria-Bertani Medium (LB-Medium) (Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)).....	38
4.3.2	ATCC Medium: 1731 (Kultivierung von <i>Zymomonas mobilis</i> ATCC 39676)	38
4.3.3	Abgewandeltes ATCC Medium [Crittenden und Playne, 2002] (Kultivierung von <i>Zymomonas mobilis</i> ATCC 39676)	38
4.3.4	Medienzusätze	39
4.4	Mikro-/ molekularbiologische Techniken	39
4.4.1	Stammhaltung	39
4.4.2	Expression der rekombinanten Fructosyltransferase	40
4.4.3	Zellaufschluss mittels Ultraschall zur Freisetzung der rekombinanten Fructosyltransferase und Aktivitätstest mit dem Zellextrakt.....	40
4.4.3.1	Lösungen und Puffer	40
4.4.3.2	Zellaufschluss.....	41
4.4.3.3	Aktivitätstest	41
4.4.4	Analyse der rekombinanten Fructosyltransferase	43
4.4.4.1	Lösungen und Puffer	43
4.4.4.2	Proteinstandard	44
4.4.4.3	Proteinanalyse nach Bradford.....	45
4.4.4.4	Proteinanalyse durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	45
4.4.5	Kultivierung von <i>Zymomonas mobilis</i>	46
4.5	Untersuchungen zur Produktbildung der Fructosyltransferase mit verschiedenen Akzeptoren.....	47
4.5.1	Fructosyltransferasen-Screening	47

4.5.2	Untersuchungen zur Produktbildung mit der Fructosyltransferase <i>SacB</i> aus <i>Bacillus megaterium</i>	48
4.5.3	Analyse der Akzeptorreaktionen	48
4.6	Immobilisierung der Fructosyltransferase	48
4.6.1	Lösungen und Puffer	48
4.6.2	Kovalente Bindung an Epoxyträger.....	49
4.6.3	Adsorption an verschiedene Träger	50
4.6.3.1	Adsorption an Bentonit	50
4.6.3.2	Adsorption an Hydroxylapatit	51
4.6.4	Einschluss der adsorbierten Fructosyltransferase.....	52
4.6.4.1	Herstellung der Alginatperlen.....	52
4.6.4.2	Bestimmung der Aktivität der Bentonit-Alginat-Immobilisate	54
4.7	Kinetische Untersuchungen der Fructosyltransferase.....	54
4.7.1	Kinetische Experimente mit nativer Fructosyltransferase	54
4.7.2	Kinetische Experimente mit adsorbierter Fructosyltransferase.....	55
4.7.3	Kinetische Experimente mit eingeschlossener Fructosyltransferase	56
4.7.4	Modellierungen mittels der Software ModelMaker3®.....	57
4.8	Aufreinigung und Analyse der neuartigen Produkte	57
4.8.1	Untersuchungen zur reaktionsintegrierten Produktadsorption an Zeolithen	57
4.8.2	Chromatographische Techniken	58
4.8.2.1	Dünnschichtchromatographie (DC)	58
4.8.2.2	Analytische HPLC bzw. HPAEC	59
4.8.2.3	Präparative Chromatographie	62
4.8.3	Untersuchungen zur mikrobiellen Aufreinigung mittels <i>Zymomonas mobilis</i>	64
4.8.4	Analyse der neuartigen FOS.....	64
4.9	Kontinuierlicher Prozess zur Produktion von neuartigen Fructooligosacchariden	65
5	Ergebnisse und Diskussion.....	66
5.1	Untersuchungen zur Produktbildung der Fructosyltransferase mit verschiedenen Akzeptoren.....	66
5.1.1	Fructosyltransferasen-Screening	66
5.1.2	Untersuchungen zur Produktbildung mit der Fructosyltransferase <i>SacB</i> aus <i>Bacillus megaterium</i>	68
5.1.2.1	Produktbildung mit Isomaltulose als Akzeptor.....	68
5.1.2.2	Produktbildung mit Xylose als Akzeptor	69

5.1.2.3	Produktbildung mit Galacturonsäure als Akzeptor.....	70
5.1.3	Kapitelzusammenfassung.....	73
5.2	Immobilisierung der Fructosyltransferase.....	74
5.2.1	Kovalente Bindung an Sepabeads® EC-EP (Resindion)	74
5.2.2	Adsorption an Bentonit bzw. Hydroxyapatit.....	77
5.2.3	Matrizeinhüllung der Fructosyltransferase.....	83
5.2.4	Kapitelzusammenfassung.....	86
5.3	Kinetische Untersuchungen der Fructosyltransferase.....	87
5.3.1	Erstellung eines kinetischen Modells mit der Software ModelMaker3®	87
5.3.2	Kinetische Modellierungen von Batch-Versuchen	91
5.3.2.1	Bestimmung der kinetischen Parameter der nativen Fructosyltransferase	91
5.3.2.2	Bestimmung der kinetischen Parameter der adsorbierten Fructosyltransferase	96
5.3.2.3	Bestimmung der kinetischen Parameter der nach Adsorption eingeschlossenen Fructosyltransferase	99
5.3.2.4	Vergleich der kinetischen Parameter der nativen, adsorbierten und eingeschlossenen Fructosyltransferase	102
5.3.2.5	Abschätzung des zu erwartenden Katalysatornutzungsgrads	104
5.3.3	Kapitelzusammenfassung.....	105
5.4	Aufreinigung und Analyse der neuartigen Fructo- oligosaccharide.....	106
5.4.1	Untersuchungen zur reaktionsintegrierten Produktadsorption an Zeolithen	106
5.4.2	Chromatographische Aufreinigung der neuen Fructooligosaccharide	110
5.4.2.1	Biogel	110
5.4.2.2	Anionenaustauscher	112
5.4.2.3	Kationenaustauscher	114
5.4.2.4	Vergleich der Austauschmaterialien.....	118
5.4.3	Untersuchungen zur mikrobiellen Aufreinigung mittels <i>Zymomonas mobilis</i>	120
5.4.4	Analyse der neuartigen Fructooligosaccharide	123
5.4.5	Kapitelzusammenfassung.....	123
5.5	Kontinuierliche Produktion der neuen Fructooligosaccharide... 	125
5.5.1	Optimierung der kontinuierlichen Synthese des Galacturonsäure-Fructosids durch mathematische Simulation	125
5.5.2	Kontinuierliche Synthese des Galacturonsäure-Fructosids	130
5.5.2.1	Aufbau des kontinuierlich betriebenen Systems zur Produktion von FOS	130
5.5.2.2	Untersuchungen zur kontinuierliche Synthese des Galacturonsäure-Fructosids ...	131

5.5.3	Kapitelzusammenfassung.....	133
6	Zusammenfassung	135
7	Literaturverzeichnis.....	140
8	Abkürzungs- und Symbolverzeichnis	159
9	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	163
10	Anhang	171

1. Einleitung

Die gezielte Herstellung von Produkten über biotechnologische Verfahren gewinnt gegenüber der chemischen Synthese zunehmend an Bedeutung. Nach der bereits gut etablierten sogenannten roten und grünen Biotechnologie hat die weiße bzw. industrielle Biotechnologie in den letzten Jahren einen großen Aufschwung erfahren. Die entscheidenden Triebkräfte für die Umstellung industrieller Prozesse auf biotechnologische Verfahren sowie die Entwicklung neuer Produkte sind [Antranikian, 2006]:

- Einsparung von Rohstoffen und Energie, insbesondere in Hinblick auf die zunehmend knapperen fossilen Rohstoffe, die damit verbundene Kostenexplosion sowie die politischen Vorgaben zur CO₂-Emissionsreduktion [Flaschel et al., 2004]
- Prozessvereinfachung, indem mehrstufige chemische Syntheseverfahren durch biotechnologische Verfahren (mikrobielle Kultivierung, Fermentation bzw. enzymatische Synthese) ersetzt werden (z.B. Vitamin B₂ Produktion bei der BASF) [Bachmann et al., 2004; Saling, 2008]
- Optimierung der Produktaufarbeitung und –reinigung im Vergleich zu chemischen Synthesewegen (z.B. Acrylamid Produktion [Nagasawa und Yamada, 1995])
- Vermeidung bzw. Verringerung von Neben- und Abfallprodukten (z.B. 7-ACS Produktion [Buchholz et al., 2005])

Derzeit liegt der Anteil biotechnologisch hergestellter Produkte am weltweiten Umsatz in der chemischen Industrie bei etwa 5 %. Die intensivste Anwendung findet im Bereich der Feinchemikalien statt, die sich auf einen Umsatzanteil von 15 % beläuft. Der Anteil der an der Herstellung von Feinchemikalien und Pharmaprodukten beteiligten Enzyme ist mit 4-5 % des Weltmarktes vergleichsweise gering [Antranikian, 2006; Bachmann, et al., 2004; Festel, 2003; Festel et al., 2004; Rhein et al., 2011; Studie von McKinsey & Company, 2003].

Im Zuge des Klimaschutzes und der zunehmenden Verknappung der fossilen Rohstoffe erlangen nachwachsende Rohstoffe immer mehr Aufmerksamkeit. Besonders Kohlenhydrate, die mit 75 % den größten Anteil an nachwachsender Biomasse liefern, stellen damit den wichtigsten Ausgangspunkt für die Herstellung von Bulk- und Feinchemikalien (z.B. Zitronen-, Essig- und Milchsäure, FOS) sowie neuen Materialien (z.B. Bioplastik) und Energieträgern (z.B. Bioethanol) dar [Lichtenthaler, 2004; Abbildung 2.1]. Dabei steht für die biotechnologische Produktion von wertschöpfenden

Produkten neben den natürlichen Polysacchariden, wie Stärke und Cellulose, eine Reihe an niedermolekularen Kohlenhydraten in industriellem Maßstab zur Verfügung. Das Produktionsvolumen von Saccharose aus Zuckerrüben bzw. Zuckerrohr lag im Wirtschaftsjahr 2010/11 bei 167 Mio. t weltweit [WVZ und VdZ, 2011]. Aus dieser sind in nachfolgenden Schritten eine Vielzahl von Produkten möglich [Antranikian, 2006].

Oligosaccharide und insbesondere Fructooligosaccharide sind in den letzten Jahren wegen ihrer präbiotischen Eigenschaften in den Fokus der Forschung gerückt. Sie stellen interessante Zielprodukte für die pharmazeutische, kosmetische und ernährungstechnische Industrie dar [Buchholz und Seibel, 2003]. Definierte chemische Reaktionen mit Mono-, Di-, Oligo- oder Polysacchariden sind aufgrund der komplexen Stereochemie von Kohlenhydraten oft nicht möglich bzw. nicht wirtschaftlich. Durch die Identifikation von Enzymen mit neuartigen Funktionen, wie z.B. erweitertes Substrat- oder Produktspektrum, sollen neue Möglichkeiten zur Synthese kurzkettiger Oligosaccharide ermöglicht werden.

Bei der enzymatischen Synthese von Oligosacchariden werden vorwiegend Leloir-Glycosyltransferasen eingesetzt. Diese bieten zwar einerseits die Möglichkeit der regio- und stereoselektiven Glycosylierung, andererseits ist ihre Verwendung mit hohen Kosten für nur kleine Mengen an Produkten verbunden, da sie nucleotidaktivierte Zucker als Substrate benötigen [Zhang et al., 2003]. Den Leloir-Glycosyltransferasen stehen die Nicht-Leloir-Glycosyltransferasen gegenüber. Diese nutzen für die Oligosaccharidsynthese Saccharose als Substrat, eines der billigsten Naturprodukte (Produktionsvolumen aus Zuckerrüben bzw. Zuckerrohr im Wirtschaftsjahr 2010/11: 167 Mio. t weltweit [WVZ und VdZ, 2011]).

2. Theoretische Grundlagen

Kohlenhydrate stellen mit 75 % ($\sim 130 \text{ Mrd. t a}^{-1}$) den größten Anteil an nachwachsender Biomasse (Abbildung 2.1) [Lichtenthaler, 2004]. Sie spielten schon früh in der Geschichte des täglichen Lebens der Menschen eine wichtige Rolle, indem sie z.B. als Nahrung, Brennholz und Ausgangsstoff für weitere Produkte (Papier, Textilien) dienten. Eine große Bedeutung hat auch die stoffliche Nutzung von Kohlenhydraten.

Bei dieser werden sie in der Biotechnologie als Energie- und Kohlenstoffquelle für Kultivierungs- und Fermentationsprozesse zur Herstellung von verschiedenen Rohstoffen (z.B. für Bioplastik) und organischen Lösungsmitteln eingesetzt. In der chemischen Industrie dienen sie z.B. als Rohstoff zur Herstellung von Tensiden, Polyolen und anderen Produkten [Oertel, 2007].

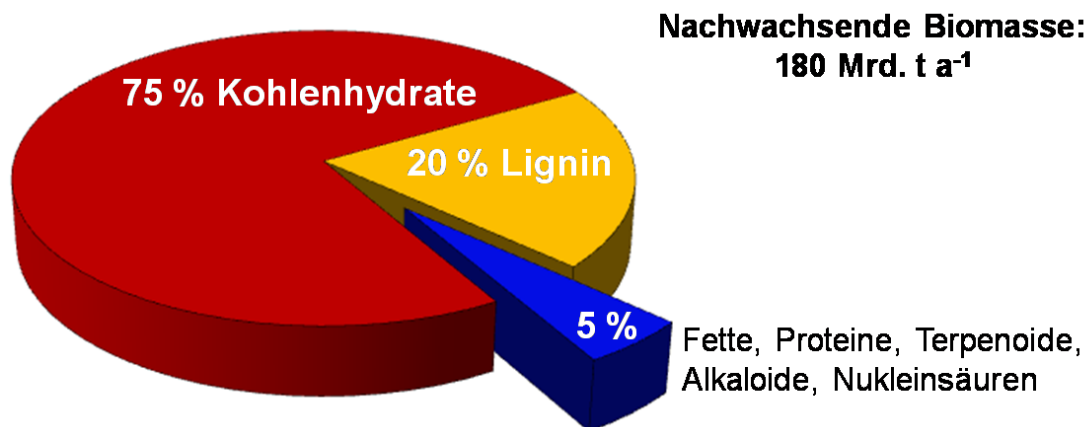


Abb. 2.1 Markt an nachwachsender Biomasse

Die energetische Verwendung von Kohlenhydraten (Bioethanol u.a. Biokraftstoffe) hat insbesondere durch die Verabschiedung der Richtlinie 2009/28/EG (Erneuerbare-Energien-Richtlinie) durch das Europäische Parlament und den Rat der Europäischen Union [Richtlinie 2009/28/EG, 2009] sowie die Biokraftstoff-Nachhaltigkeitsverordnung [Biokraft-NachV, 2009] des Bundes an großer Bedeutung gewonnen. Sie kann dazu beitragen, dass organische Chemikalien aus petrochemischen Quellen durch jene aus Biomassequellen ersetzt werden könnten [Hatti-Kaul et al., 2007; Lichtenthaler, 2011].

Jedoch werden bislang lediglich 4 % der Kohlenhydratbiomasse für technische Anwendungen verwendet [Lichtenthaler, 2011].

Mit den ersten Anwendungsmöglichkeiten von Oligosacchariden und glycosylierten Substanzen in der Pharma- und Lebensmittelindustrie haben sie an Hochschulen und in der Industrie an großer Beachtung gewonnen.

2.1. Oligosaccharide

Im Allgemeinen werden Kohlenhydrate, die aus 2 bis 10 Monosaccharideinheiten bestehen und über O-glycosidische Bindungen miteinander verknüpft sind, Oligosaccharide genannt. Die Monosaccharide können sowohl linear (unverzweigt) als auch nicht-linear (verzweigt) miteinander verknüpft sein [Ernst et al., 2000; Hart, 1989; McNaught, 1997].

Oligo- und Polysaccharide kommen als natürliche Bestandteile in Zellwänden von Pflanzen und Mikroorganismen vor, wo sie als stabile Stütz- und Gerüstelemente dienen. Als Glykokonjugate bilden sie auf der eukaryotischen Zelloberfläche die Glycocalyx, die für Adhäsion, Signaltransduktion, Zellerkennung, Zellwachstum und Differenzierung der Zellen verantwortlich ist [Dwek, 1996].

2.1.1. Physiologische Effekte neuer Oligosaccharide

2.1.1.1. Einsatzmöglichkeiten von Oligo- und Polysacchariden

Oligo- und Polysaccharide werden bereits in vielen kommerziellen Produkten der Kosmetikindustrie, Ernährungsindustrie (z.B. als „Functional Food“) und in der Medizin eingesetzt.

Polysaccharide, wie z.B. Hyaluronsäure, Galactan und Oligofructose, werden in kosmetischen Produkten verwendet [Lautenschläger, 2009; Sutherland, 1998].

Viele Oligosaccharide und insbesondere Fructooligosaccharide (FOS) sind aus ernährungsphysiologischer Sicht sehr interessant. Dabei gehören Xylosyl-, Galactosyl-, Palatinosyl- und Fructosyl-Oligosaccharide zu den quantitativ wichtigsten Lebensmittelkohlenhydraten [Arrigoni und Amadò, 2009; Holm, 2001; Steingass et al., 2006]. Ihre präbiotischen Effekte wurden in vielen wissenschaftlichen Veröffentlichungen dokumentiert. Darin wurden am eindeutigsten die Effekte für die FOS nachgewiesen [Frey et al., 2001; Guillon und Champ, 2000; Holm, 2001; Hoshi et al., 1994; Hsu et al., 2004; Kaname, 1982; Khanna et al., 2006; Van Loo et al., 1999; Voragen, 1998].

„Functional Food“ mit seinen positiven Effekten auf die Darmflora beinhaltet z.B. Inulin, Oligofructose und Isomaltulose [Gibson, 1999; Gibson et al., 1995; Kaur und Gupta, 2002; Roberfroid, 2002].

Saccharoseisomere, wie z.B. Isomaltulose, werden als Süßungsmittel verwendet. Die Vorteile der FOS als Süßungsmittel sind ein geringer Kaloriengehalt, sie sind diabetikergeeignet und nicht kariogen [Kaur und Gupta, 2002; Yun, 1996].

Weitere positive Eigenschaften für die Gesundheit des Menschen sind das Senken des Risikos von Osteoporose, indem sie die Mineraladsorption, insbesondere von Calcium, erhöhen sowie die Senkung des Cholesterins im Blut und die Darmkrebs vorbeugende Wirkung [Griffin et al., 2003; Kaur und Gupta, 2002; Roberfroid, 1993 & 2002; Wattenberg, 1992].

Derzeit werden immer mehr Anwendungsmöglichkeiten für Oligosaccharide in der pharmazeutischen Industrie beschrieben, wie z.B. die Entwicklung von diagnostischen Tests, von antibakteriellen und antiviralen Impfstoffen, Therapeutika z.B. gegen Krebs sowie der Einsatz zur Neutralisation von Toxinen [Ghazarian, 2011; Macmillian und Daines, 2003; Pool-Zobel, 2005; Seeberger und Werz, 2007; Taper und Roberfroid, 2000].

2.1.1.2. FOS als Präbiotika

Präbiotika sind „Nicht verdaubare Lebensmittelbestandteile, die ihren Wirt günstig beeinflussen, indem sie das Wachstum und/ oder die Aktivität einer oder mehrerer Bakterienarten im Dickdarm gezielt anregen und somit die Gesundheit des Wirts verbessern“ [Gibson und Roberfroid, 1995]. Sie gehören neben Probiotika zu den häufigsten Lebensmittelzusätzen.

FOS, wie Inulin und Oligofructose, passieren den Magentrakt unverdaut und fördern im Dickdarm die Entwicklung der probiotischen Darmflora, indem sie die Vermehrung der gesundheitsfördernden Bakterien, wie *Lactobacilli* oder *Bifidobacteria*, fördern, wodurch potentiell pathogene Mikroorganismen verdrängt werden [Jenkins et al., 1999; Rastall und Hotchkiss, 2003; Yun, 1996]. Breite Anwendung finden sie bereits im „Functional Food“ z.B. als Cerealien und in Joghurts.

2.2. Glycosyltransferasen

Die Entdeckung des mikrobiellen Einflusses bei der Gelierung von Rohrzucker durch Pasteur im Jahre 1861 [Pasteur, 1861] führte zu der Identifizierung des Bakteriums *Leuconostoc mesenteroides* durch van Tieghem (1878). Hehre (1941) konnte durch keimfreie Filterversuche beweisen, dass die Gelierung auf ein extrazelluläres Enzym zurückzuführen ist. Glycosyltransferasen konnten in vielen verschiedenen Mikroorganismen gefunden werden, wie z.B. in Pilzen (*Aspergillus* sp., *Penicillium* sp.), Hefen (*Aureobasidium* sp.) und Bakterien (*Lactobacillus* sp, *Streptococcus mutans*, *Bacillus subtilis* [Cheetham et al., 1989], *Bacillus megaterium* [Biedendieck, 2007]) [Baciu et al., 2005].

Glycosyltransferasen katalysieren den Transfer einer Zuckereinheit von einem aktivierten Donormolekül auf ein spezifisches Akzeptormolekül, indem sie eine glycosidische Bindung bilden.

Für die Biosynthese von natürlichen Di-, Oligo- und Polysacchariden dienen Glycosyltransferasen (EC 2.4.x.y) als Katalysatoren. Dabei unterscheidet man diese Enzyme hinsichtlich ihres Substrates in zwei Klassen: (1) Leloir-Transferasen und (2) Nicht-Leloir-Transferasen [Leloir, 1971] (Abbildung 2.2), die nach dem argentinischen Biochemiker und Nobelpreisgewinner Luis Federico Leloir benannt wurden.

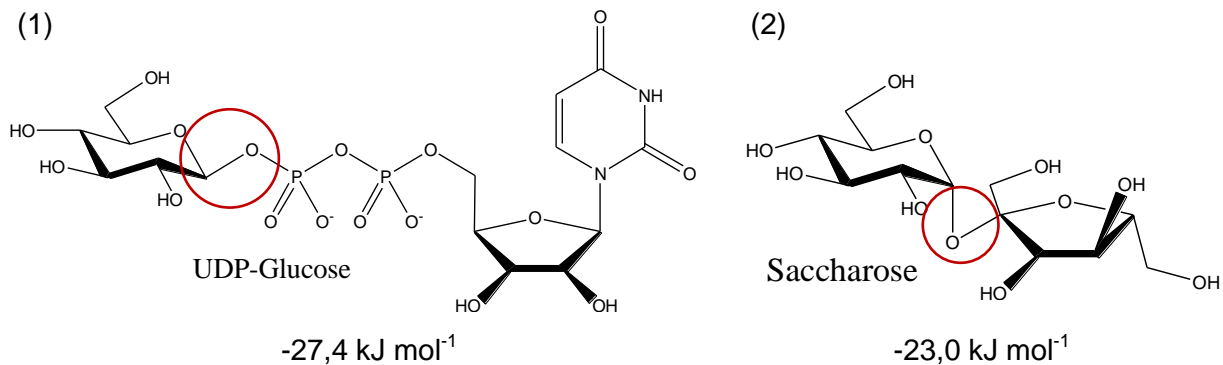


Abb. 2.2 (1) Nucleotidaktivierte Glucose als Substrat für Leloir-Glycosyltransferase und (2) Saccharose als Substrat für Nicht-Leloir-Glycosyltransferase

2.2.1. Leloir-Transferasen

Glycosyltransferasen des Leloir-Typs verwenden nucleotidaktivierte Zucker (UDP-Glucose, UDP-Xylose, ...) als Donoren, um den Glycosylteil des aktivierten Zuckermoleküls auf spezifische Akzeptoren (Hydroxylgruppe eines anderen Zuckers, eine Serin-, Threonin- oder Asparaginseitenkette eines Proteins oder allgemein hydroxylische Gruppen z.B. auch phenolische) zu übertragen [Elling, 1997; Roseman, 2001] (Abbildung 2.3).

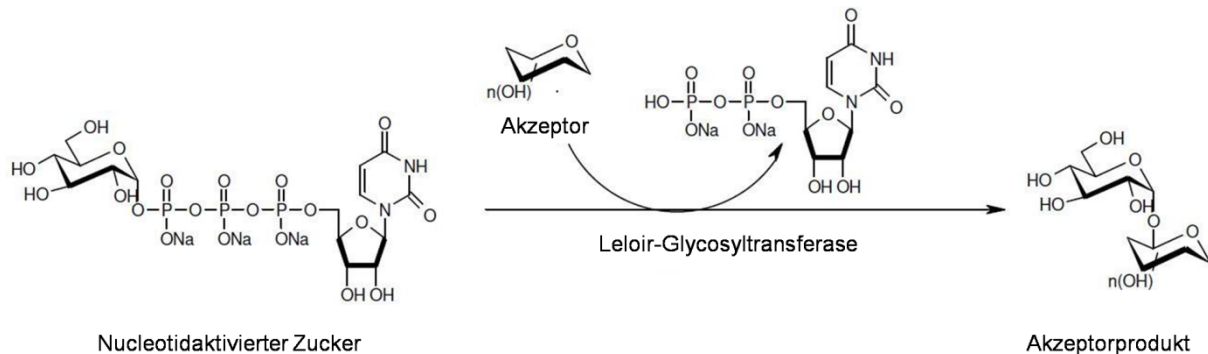


Abb. 2.3 Glycosylierung mit Leloir-Glycosyltransferase

Glycosyltransferasen dieses Typs zeichnen sich durch eine hohe Regio- und Stereoselektivität aus. Sie sind im Allgemeinen substratspezifisch, tolerieren jedoch kleine Modifikationen an Donor und Akzeptor [Elling, 1997; Seibel et al., 2006a; Qian et al. 2000]. Allerdings sind die Anwendungen von Leloir-Glycosyltransferasen aufgrund der hohen Kosten von nucleotidaktivierten Substraten bzw. deren Regeneration sowie die Verfügbarkeit der Enzyme eingeschränkt.

2.2.2. Nicht-Leloir-Transferasen

Nicht-Leloir-Glycosyltransferasen nutzen für den Transfer der Glycosylgruppe einfache, nicht nucleotidaktivierte Saccharide (Saccharose, Stärke), wobei deren glycosidische Bindung die Energie liefert (Abbildung 2.2 bzw. 2.4). Die Gruppe der Nicht-Leloir-Glycosyltransferasen beinhalten z.B. Phosphorylasen, Glucansucrasen und Fructosyltransferasen (z.B. Levansucrase, EC 2.4.1.10).

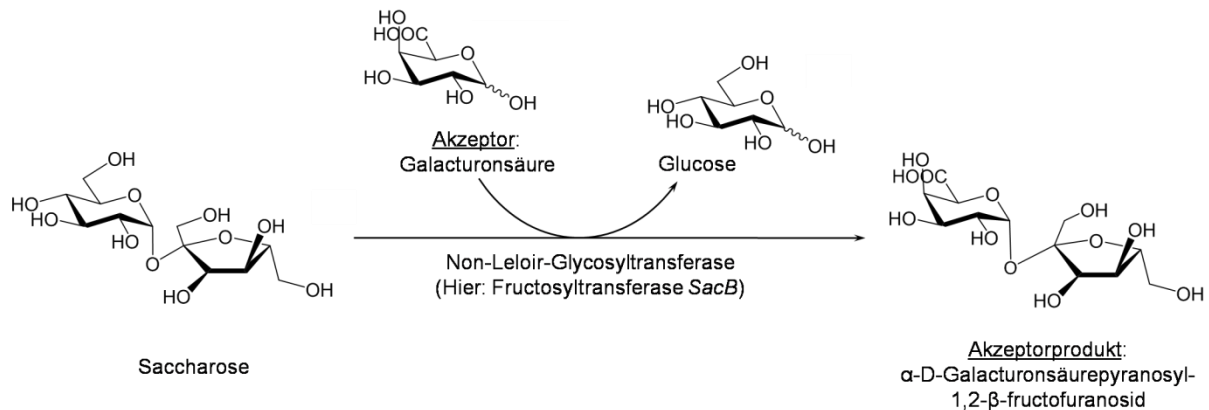


Abb. 2.4 Glycosylierung des Akzeptors mit Fructosyltransferase *SacB* aus *Bacillus megaterium*

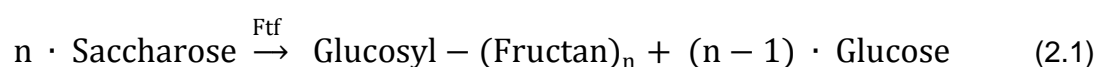
2.3. Fructosyltransferase: Struktur, Reaktionsmechanismus und FOS Synthese

Ausgehend von ihrem Ursprung kann man Fructosyltransferasen in zwei Gruppen unterteilen [Hendry und Wallace, 1993]:

1. Pflanzliche Fructosyltransferasen (z.B. in Chicorée, Artischocken, Zwiebeln)
2. Mikrobielle Fructosyltransferasen (aus Pilzen: *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp.; aus Hefen: *Aureobasidium* sp.; aus Bakterien: *Lactobacillus* sp., *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*)

2.3.1. Struktur und Substratreaktion mikrobieller Fructosyltransferasen

Fructosyltransferasen, die zur Familie der Glycosid-Hydrolasen (GH 68; Database of Carbohydrate-Active enZYme; CAZY) gehören, katalysieren die Bildung von FOS und Fructan-Polymeren ausgehend von dem Substrat Saccharose. Dabei können die Fructane eine Größe von 10^6 Da erreichen [Vijn und Smeekens, 1999]. Die Reaktionsgleichung wird durch folgenden Zusammenhang beschrieben (Gleichung 2.1):



Abhängig von der Art der eingebauten Verknüpfungen in ihre Produkte unterteilt man die Fructosyltransferasen in [Dedonder, 1966; Van Hijum, 2006]:

1. Inulosucrase (EC 2.4.1.9; Produkt: Inulin; $\beta(2\rightarrow1)$ verknüpfte Fru-Einheiten)
2. Levansucrasen (EC 2.4.1.10; Produkt: Levan; $\beta(2\rightarrow6)$ verknüpfte Fru-Einheiten)

1-Kestose ist das kürzeste Inulin-Fructan (Abbildung 2.5), das kürzeste Levan-Fructan ist 6-Kestose (Abbildung 2.6).

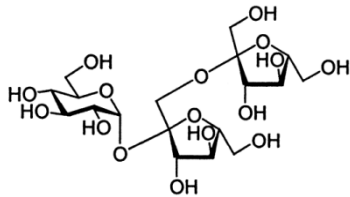


Abb. 2.5 1-Kestose (kürzestes Inulin-Fructan)

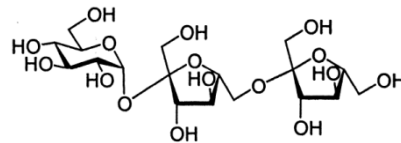


Abb. 2.6 6-Kestose (kürzestes Levan-Fructan)

Allgemein gilt, dass bei niedrigen Substratkonzentrationen die Hydrolyse, hingegen bei hohen Konzentrationen die Polymerbildung überwiegt [Chambert et al., 1974; Meng und Fütterer, 2003].

Für die Bildung des Fructans wird ein Saccharosemolekül als Initiator benötigt, an dessen freie C-6 Hydroxylgruppe der Fructose eine weitere Fructosyleinheit geknüpft wird. Der Reaktionsmechanismus wird als „Doppel-Verdrängungsmechanismus“ (auch: Ping-Pong-Mechanismus oder „double-displacement“) bezeichnet [André et al., 2003; Chambert et al., 1974; Homann, 2009; Seibel et al., 2006c]. Die Reaktion der Transfructosylierung erfolgt in den folgenden Schritten:

1. Bildung eines Enzym-Saccharose-Komplexes
2. Hydrolytische Spaltung der glycosidischen Bindung unter Freisetzung von Glucose; Fructose-Enzym-Verbindung bleibt bestehen
3. Anlagerung des Komplexes an ein Akzeptormolekül (Saccharose), z.B. an die freie C-6-Hydroxylgruppe, unter Ausbildung einer glycosidischen Bindung

In dieser Arbeit wurde mit der Levansucrase *SacB* aus *Bacillus megaterium* DSM 319 gearbeitet (sucrose:[6]- β -D-fructofuranosyl-(2 \rightarrow) $_{\text{n}}$ α -D-glucopyranoside 6- β -D-fructosyltransferase, EC 2.4.1.10). Dabei handelt es sich um ein extrazelluläres Enzym mit einer relativen Molekülmasse von 52 kDa. Es wurde erstmals von Dr. Rebekka Biedendieck (2007) aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Jahn (TU Braunschweig) identifiziert. *SacB* besteht aus 484 Aminosäuren, welches ein 29 Aminosäuren langes Signalpeptid am N-Terminus

(Abbildung 2.7) beinhaltet. Der Aminosäuresequenzvergleich mit der Levansucrase aus *Bacillus subtilis* (*SacB*) liefert eine Übereinstimmung von 73 %. Daher wurde es ebenfalls *SacB* genannt [Biedendieck, 2007].



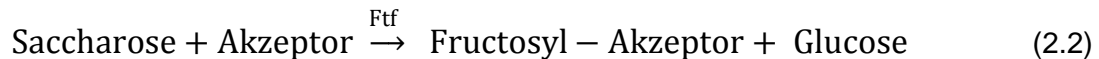
Abb. 2.7 Schematische Darstellung der Polypeptidkette von *SacB* aus *Bacillus megaterium* (rot: Signalpeptid; gelb: katalytische Domäne)

Meng und Fütterer (2003) stellten mit der Kristallstruktur der Levansucrase *SacB* aus *Bacillus subtilis* erstmals eine Struktur aus der Familie GH 68 dar. Kristallstrukturen von fünf *SacB*-Varianten (Y247A, Y247W, N252A, D257A, K373A) aus *Bacillus megaterium* (Auflösungen zwischen 1,75 und 2,0 Å) zeigten, dass diese, wie die Levansucrase aus *Bacillus subtilis*, eine fünfblättrige Propeller β -Struktur besitzen [Strube, 2011]. Die verschiedenen *SacB*-Varianten zeigten keine Veränderung oder Inaktivierung in der Architektur des aktiven Zentrums. Der Vergleich der kinetischen Parameter der Varianten mit dem Wildtypenzym zeigt nur leichte Abweichungen. Allerdings konnte anhand der Kristallstrukturen der *SacB*-Varianten erstmals gezeigt werden, dass Aminosäuren, die außerhalb des aktiven Zentrums lokalisiert sind, auf die Synthese von Polysacchariden bei Glycosyltransferasen einen definierten Einfluss haben. Die Strukturen deuten auf eine mögliche Anordnung von Aminosäuren für die Bindung einer Akzeptor-Fructosylkette auf der Oberfläche des Enzyms hin. Die wachsende Fructosylkette wird stabilisiert, indem die Aminosäuren Y247, N252 und K373 eine mögliche Plattform bilden. Den ausgetauschten Aminosäuren konnten eindeutige Bindungsstellen für die Zuckerkette zugeordnet werden. So werden von den Varianten Y247A, N252A und K373A definierte Mischungen aus Oligosacchariden synthetisiert. [Strube, 2011; Strube et al., 2011].

2.3.2. Akzeptorreaktion der Fructosyltransferase und FOS Synthese

Zusätzlich zur Fructanbildung [Dedonder, 1966] können einige Levansucrasen Fructosyleinheiten auf Wasser (Invertaseaktivität) und andere effiziente Akzeptoren, wie z.B. die Zucker Glucose, Fructose und Raffinose, transferieren (Gleichung 2.2) [Avigad et al., 1957; Cheetham et al., 1989; Cote und Ahlgren, 1993; Seibel et al., 2006b; van Hijum et al.,

2004]. Aber auch kurzkettige Acylalkohole, Sorbitol und andere Mono- bis Tetrasaccharide können als Akzeptoren dienen, wenn sie in hohen Konzentrationen vorliegen [Chambert und Petit-Glatron, 1991; Feingold et al., 1956; Hestrin et al., 1956; Hestrin und Avigad, 1958]. Untersuchungen zeigten, dass Levansucrasen verschiedensten Ursprungs ein hohes Potential zur Synthese neuer FOS mit unterschiedlichen Akzeptoren besitzen [Cheetham et al., 1989; Dedonder, 1966; Ohtsuka et al., 1992; Perez-Oseguera et al., 1996; Seibel et al., 2006b].



Typische Akzeptoren zur Synthese von FOS bzw. Saccharose-Analoga sind Mono-saccharide, wie z.B. Glucose, Xylose und Galactose, Disaccharide, wie Lactose, Isomaltose und Melibiose, oder Oligosaccharide, wie Oligodextrane oder Maltodextrine.

Für die Fructosyltransferase *Suc1* aus *Aspergillus niger* wurden in erster Linie Anwendungen zur Transfructosylierung von Saccharose-Analoga als Substrat und anderen Akzeptoren beschrieben [Beine et al., 2008; Homann, 2009; Zuccaro et al., 2008]. Für die Synthese von Saccharose-Analoga finden hingegen eher die Fructosyltransferasen aus den *Bacilli*-Stämmen Einsatz [Baciu, 2005; Beine et al., 2008; Homann, 2009; Seibel et al., 2005 & 2006b].

Seibel et al. (2006b) konnten in kinetischen und Docking-Experimenten zeigen, dass die Levansucrase aus *Bacillus subtilis* nur eine Akzeptorbindungsstelle besitzt, die identisch mit der Substratbindungsstelle ist. Der Transfer der Glycopyranoside ist thermodynamisch kontrolliert.

In dieser Arbeit wurden die Akzeptoren Isomaltulose, Xylose und Galacturonsäure untersucht. Zuckersäuren, wie die Galacturonsäure, stellen wenig untersuchte Akzeptoren zur Bildung von Fructosylverbindungen dar [Ringpfeif et al., 2007]. Im Alltag begegnen uns die Zuckersäuren in den unterschiedlichsten Bereichen. So dient z.B. die Gluconsäure, die aus Traubenzucker hergestellt wird, als Abbindeverzögerer für Beton oder als Säureregulator in der kosmetischen und lebensmitteltechnischen Industrie. Darüber hinaus ist sie auch in der Pharmazie von großer Bedeutung, da mit ihr Spurenelemente, wie Calcium, Eisen und Zink, besser vom Körper aufgenommen werden [Grünwald et al., 2009]. Diese vielseitigen Anwendungsspektren der Gluconsäure vermitteln einen Eindruck über das Potential von Zuckersäuren und deren Produkte für zahlreiche Anwendungen in vielen Lebensbereichen.

2.4. Bestimmung der kinetischen Parameter einer Enzymreaktion

Für den industriellen Einsatz ist die Kinetik der freien (nativen) und immobilisierten Enzyme von großer Bedeutung. Sie dient der quantitativen Beschreibung der Umsatzraten der Reaktionsparameter einer enzymatischen Reaktion unter Berücksichtigung der Prozessparameter, wie z.B. Konzentration, Temperatur und pH-Wert.

Für die Angabe der Enzymaktivität sind zwei Systeme gängig:

1. die „Enzyme unit“ (Symbol U oder unit) [International Union of Biochemistry, 1961], definiert als diejenige Enzymmenge, die unter Standardbedingungen 1 μmol des Substrates pro Minute umsetzt
2. die SI-Einheit katal (Symbol kat) [International Union of Biochemistry, 1973], definiert als die Enzymaktivität, ausgedrückt als Mol umgesetztes Substrat pro Sekunde

2.4.1. Ein-Substrat-Kinetik

Enzyme können sowohl Ein-Substrat- als auch Mehr-Substrat-Reaktionen katalysieren. Im einfachsten Fall, in dem nur ein Substrat umgesetzt wird, kann die Geschwindigkeit der enzymatischen Umsetzung des Substrats S in das Produkt P durch die Michaelis-Menten-Kinetik beschrieben werden [Michaelis und Menten, 1913]. Das Modell beruht auf der Reaktionsfolge des folgenden Schemas (Gleichung 2.3):



Der erste Schritt einer enzymatischen Reaktion ist die Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes ES. In der Michaelis-Menten-Theorie (1913) wird die enzymatische Umsetzung eines Substrats S in das Produkt P als irreversibler Zerfall des Enzym-Substrat-Komplexes ES betrachtet. Bis zur Substraterschöpfung bleibt die Konzentration des ES-Komplexes konstant (steady state). Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k_2 ist sehr viel kleiner als k_1 und k_{-1} , so dass die Zerfallsreaktion des ES-Komplexes in Produkt und freies Enzym

geschwindigkeitsbestimmend ist. Unter Berücksichtigung der von Leonor Michaelis und Maud Menten (1913) aufgestellten Vereinfachungen kann für die Sättigungshyperbel der Michaelis-Menten-Theorie folgende mathematische Gleichung aufgestellt werden (Gleichung 2.4) [Lasch, 1987]:

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (2.4)$$

Der K_M -Wert ist die Michaelis-Menten-Konstante, die die Substratkonzentration bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit darstellt. K_M ist ein Maß für die Affinität eines Enzyms zu einem Substrat. Je kleiner K_M ist, desto größer ist die Affinität bzw. desto geringer ist die benötigte Substratkonzentration, um die halbmaximale Geschwindigkeit zu erreichen.

Abbildung 2.8 zeigt die Konstellation bei Halbsättigung (K_M) und Sättigung des Enzyms mit Substrat (v_{\max}).

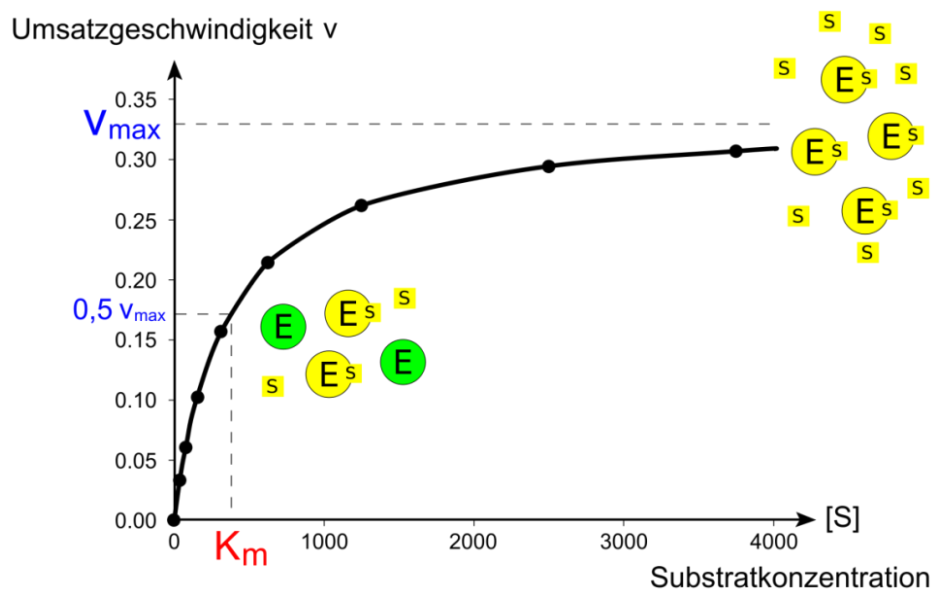


Abb. 2.8 Michaelis-Menten-Kinetik einer enzymatischen Reaktion [Yikrazuul, 2010]

Jedoch folgen nicht alle Enzyme diesem Gesetz, insbesondere wenn inhibierende Effekte auftreten [Lasch, 1987].

2.4.2. Zwei-Substrat-Kinetik

Bei der Michaelis-Menten-Theorie wird angenommen, dass nur ein Substrat am Umsatz beteiligt ist. In der Natur sind solche Ein-Substrat-Reaktionen allerdings verhältnismäßig selten. An den meisten enzymkatalysierten Reaktionen binden zwei (oder manchmal mehr) Substrate [Liese et al., 2011; Lasch, 1987]. Die kinetische Beschreibung von Mehr-Substrat-Reaktionen ist wesentlich schwieriger als bei Ein-Substrat-Reaktionen. Inhibierungseffekte bei Mehr-Substrat-Reaktionen sind durch die Vielzahl an Faktoren deutlich schwieriger, oft sogar unmöglich, zu interpretieren [Segel, 1975].

Dennoch kann die Michaelis-Menten-Theorie in makrokinetischen Ansätzen die enzymatischen Reaktionen oft sehr gut beschreiben. Auch das in dieser Arbeit vorgestellte kinetische Modell zur Beschreibung der Akzeptorreaktion der Fructosyltransferase mit Saccharose und Galacturonsäure beruht auf einer Michaelis-Menten-Theorie. Dabei können die Enzymreaktionen mit zwei oder mehreren Substraten beschrieben werden, indem die einzelnen, für das jeweilige Substrat getrennt aufgestellten, Michaelis-Menten-Terme miteinander multipliziert werden. Voraussetzung dafür ist, dass das Gleichgewicht der Reaktion eindeutig auf einer Seite liegt [Biselli, 1991]. Im folgendem werden Reaktionen beschrieben, bei denen zwei Substrate miteinander reagieren.

Für Reaktionen mit zwei Substraten wird das entsprechende Geschwindigkeitsgesetz häufig als „Doppel-Substrat-Kinetik“ bezeichnet (Gleichung 2.5, hier: sequenzieller Mechanismus) [Liese et al., 2011; Lasch, 1987].

$$v = v_{\max} \cdot \frac{[A]}{K_{M,A} + [A]} \cdot \frac{[B]}{K_{M,B} + [B]} \quad (2.5)$$

mit: [A] = Konzentration von Substrat A

[B] = Konzentration von Substrat B

$K_{M,A}$ = Michaelis-Menten-Konstante für Substrat A

$K_{M,B}$ = Michaelis-Menten-Konstante für Substrat B

Das Verständnis der Mechanismen und die kinetische Beschreibung der Zwei-Substrat-Reaktionen erfolgt durch die weit verbreitete Nomenklatur nach Cleland (1963a-c). Die Mechanismen können in zwei große Gruppen unterteilt werden.

1. Sequenzieller Mechanismus

Abhängig in welcher Reihenfolge die Anlagerung der Substratmoleküle erfolgt, kann der sequenzielle Mechanismus weiter differenziert werden.

a) *Ordered-Bi-Bi-Mechanismus* (engl. order: geordnet, obligatorisch)

Dieser Mechanismus liegt vor, wenn zunächst ein Substratmolekül binden muss, damit das zweite Substratmolekül binden kann. Entsprechend muss erst ein Produkt den Komplex verlassen, bevor das zweite Produkt dissoziieren kann [Nelson und Cox, 2005].

b) *Random-Bi-Bi-Mechanismus* (engl. random: Zufall)

Bei diesem Mechanismus werden zunächst beide Substratmoleküle in beliebiger Reihenfolge an das Enzym gebunden, danach verlassen die Produkte in zufälliger Reihenfolge den Enzym-Substrat-Komplex [Nelson und Cox, 2005].

2. Ping-Pong-Mechanismus

Dieser Mechanismus beschreibt die Reaktionsfolge, bei der sich zunächst ein Enzym-Substrat-Komplex bildet und ein erstes Produkt den Komplex verlässt. Danach bindet ein zweites Substratmolekül und reagiert. Das Enzym liegt nach der ersten Teilreaktion in einer anderen Form vor, und wird erst wieder in die ursprüngliche überführt, wenn die zweite Teilreaktion erfolgt ist [Liese et al., 2011; Nelson und Cox, 2005].

Die in dieser Arbeit untersuchte und verwendete Fructosyltransferase reagiert nach dem Ping-Pong-Mechanismus [André et al., 2003; Chambert et al., 1974; Homann, 2009; Seibel et al., 2006c]. Die entsprechende Gleichung dafür wird im Kapitel 5.4. näher erläutert.

2.4.3. Beeinflussung der Enzymkinetik durch verschiedene Faktoren

Das aktive Zentrum des Enzyms kann direkt oder indirekt durch Veränderungen der physikalischen Umweltfaktoren (z.B. Temperatur, pH-Wert, Ionenstärke) oder durch andere Stoffe beeinflusst werden, wodurch die Reaktionsgeschwindigkeit der enzymkatalysierten Reaktion gesteigert (Aktivierung) oder gesenkt (Hemmung, Inhibierung) wird [Buchholz et al., 2005]. Für verschiedene Bereiche der Biowissenschaften ist diese Beeinträchtigung durch

Inhibitoren von sehr großem Interesse, da die Effekte vieler Wirkstoffe auf einer Hemmung oder Inaktivierung von Enzymen beruhen.

2.4.3.1. pH-Einfluss auf die Enzymreaktion

Enzyme bestehen aus Aminosäuren und können daher als Polyelektrolyte aufgefasst werden. Ihre Ladung ist abhängig vom pH-Wert. Dies gilt auch für das aktive Zentrum, dessen Aktivität durch den pH-Wert des Umgebungsmediums beeinflusst wird. Ändert sich der pH im Medium, so resultiert daraus eine Änderung des Ionisierungszustandes. Diese führt zu Konformationsänderungen, da die Tertiärstruktur eines Enzyms durch elektrostatische Wechselwirkungen der Seitenketten stabilisiert wird.

Der graphische Zusammenhang zwischen Enzymaktivität und pH-Wert entspricht üblicherweise einer glockenförmigen Kurve mit einem Optimum (Abbildung 2.9) [Lasch, 1987]. Die Gauß-Funktion stellt dafür die Grundlage dar (Gleichung 2.6):

$$y = y_0 + A \cdot e^{-\frac{(x-x_c)^2}{w^2}} \quad (2.6)$$

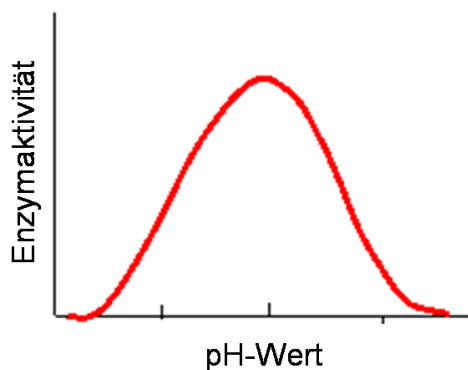


Abb. 2.9 pH-Wert-Abhängigkeit einer Enzymreaktion

2.4.3.2. Temperatur-Abhängigkeit der Enzymreaktion

Analog zu chemischen Reaktionen gilt im Allgemeinen, dass sich die Reaktionsgeschwindigkeit exponentiell mit der Temperatur ändert [Arrhenius, 1889]. Jedoch setzen oberhalb der physiologischen Bedingungen sehr schnell Denaturierungsreaktionen ein, die die Funktion des Proteins stören und schließlich ausschalten [Karlson et al., 1994; Lasch,

1987]. Die Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k wird durch die Arrhenius-Gleichung (Gleichung 2.7) beschrieben:

$$k = A \cdot e^{\frac{-E_A}{RT}} \quad (2.7)$$

mit A = Arrheniusfaktor

E_A = Aktivierungsenergie

R = universelle Gaskonstante

T = Temperatur

Die Temperaturabhängigkeit der Enzymaktivität zeigt einen langsamen Anstieg bis zu einer maximalen Reaktionsrate. Eine weitere Temperaturerhöhung bewirkt einen steilen Abfall der Reaktionsrate (Abbildung 2.10).

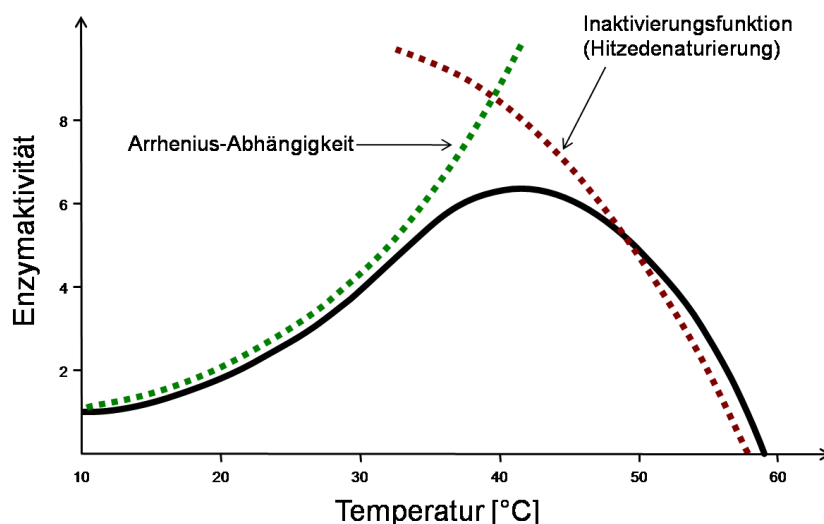


Abb. 2.10 Temperaturabhängigkeit einer Enzymreaktion

2.4.3.3. Inhibierungsmechanismen

Die Enzymaktivität kann verringert werden, indem die Bildung oder der Zerfall des Enzym-Substrat-Komplexes durch andere Verbindungen behindert wird. Abhängig von der Art des Inhibitors unterscheidet man zwischen irreversibler und reversibler Hemmung [Bisswanger, 2000; Liese et al., 2011; Nelson und Cox, 2005].

1. Bei der **irreversiblen Hemmung**, bindet ein Inhibitor irreversibel an die funktionellen Gruppen eines Enzyms, die für seine Funktion essentiell sind, und blockiert dessen katalytische Aktivität.
2. Die **reversible Enzymhemmung** kann durch Entfernen des Inhibitors, z.B. durch Dialyse, wieder beseitigt werden. Man unterscheidet die reversible Hemmung in folgende Typen:
 - a) *Kompetitive Hemmung*

Ein Inhibitor, der mit dem Substrat um die Bindungsstelle im aktiven Zentrum des Enzyms konkurriert. Meistens handelt es sich dabei um Substanzen, die der Struktur des eigentlichen Substratmoleküls sehr ähnlich sind.
 - b) *Nicht-kompetitive Hemmung*

Ein Inhibitor, der außerhalb des aktiven Zentrums des Enzyms sowohl an das Enzym als auch an den Enzym-Substrat-Komplex bindet. Somit konkurriert er nicht direkt mit der Bindungsstelle des Substrates, verhindert aber den Umsatz zum Produkt („Dead-End-Komplex“) [Liese et al., 2011].
 - c) *Unkompetitive Hemmung*

Ein Inhibitor, der an eine zweite Bindungsstelle am Enzym angreift, und dadurch den Enzym-Substrat-Komplex inaktiviert.
 - d) *Partiell-kompetitive Hemmung*

Ein Inhibitor, der sich ebenfalls an das freie Enzym und an den Enzym-Substrat-Komplex bindet. Der Unterschied zur nicht-kompetitiven Hemmung liegt darin, dass der Hemmstoff die Katalyse nicht beeinflusst.

2.5. Immobilisierung von Enzymen

Grundlegend kann man zwischen zwei Katalysatortypen unterscheiden: heterogene und homogene Katalysatoren, wobei heterogene Katalysatoren im Allgemeinen Vorteile gegenüber homogenen Katalysatoren besitzen. Die wesentlichen verfahrenstechnischen Vorteile der heterogenen Katalysatoren gegenüber den homogenen sind die leichte

Abtrennbarkeit und Wiederverwendbarkeit. Dies ist besonders in Hinblick auf eine kontinuierliche Betriebsweise von Vorteil.

Unter dem Begriff Immobilisierung versteht man, „die Einschränkung der Beweglichkeit eines Biokatalysators mit Hilfe chemischer und physikalischer Methoden“ [Hartmeier, 1986].

Der erste industrielle Einsatz eines immobilisierten Enzyms erfolgte bei der L-Aminosäure-Herstellung im Jahre 1969, bei dem das Enzym L-Aminoacylase an einen Ionenaustauscher gebunden wurde [Hartmeier, 1985].

Die erste industrielle Anwendung eines Bioprozesses mit immobilisierten Biokatalysator war die Isomerisierung von Glucose (HFCS-Prozess: 8 Mio. t a⁻¹) in den 1960er Jahren. Weitere wichtige Produkte der Weißen Biotechnologie sind: die Bulk-Chemikalie Acrylamid (Mitsubishi Rayon; 100.000 t a⁻¹), der präbiotische Zucker Isomaltulose (Südzucker; 70.000 t a⁻¹) und das 6-APA, als Vorstufe zur Synthese von semisynthetischen Penicillinen (DSM, Sandoz; 10.000 t a⁻¹) [Buchholz et al., 2005; Flaschel et al., 2004].

Es gibt eine Reihe von Immobilisierungsvorschriften, die in Monographien, wie z.B. von Guisan (2006) oder Mosbach (1988; 1987a; 1987b; 1976), zusammengefasst sind. Die meisten dieser Vorschriften können in chemische und physikalische Methoden unterteilt werden (Abbildung 2.11).

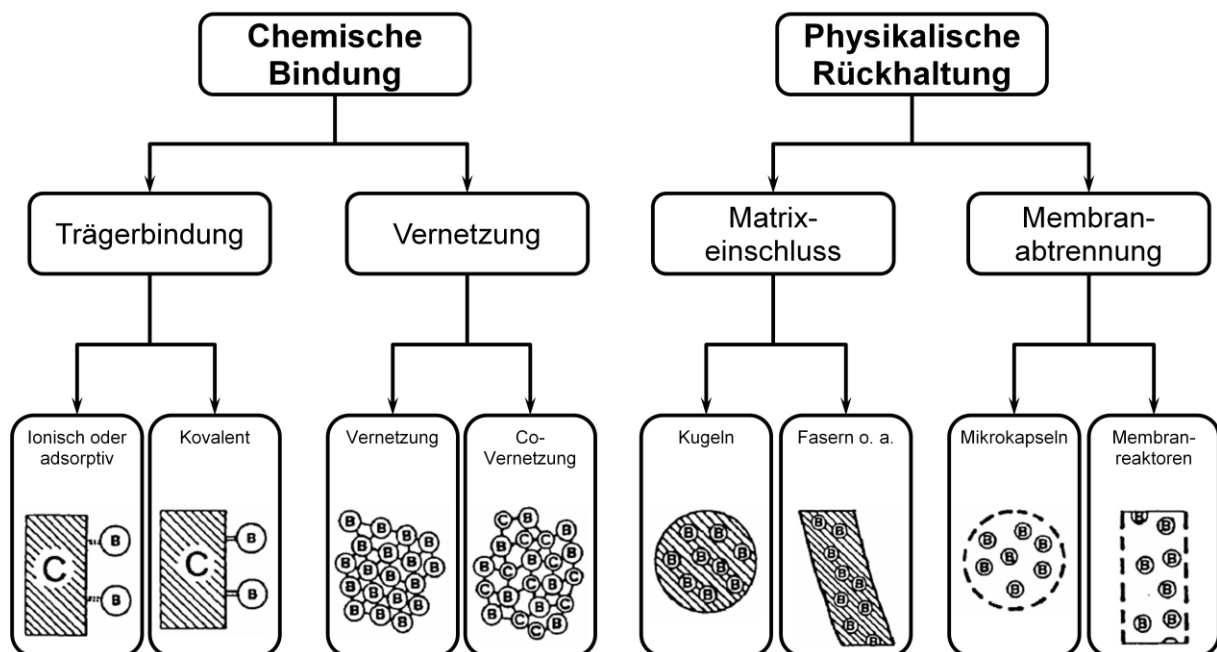


Abb. 2.11 Übersicht der Grundverfahren zur Immobilisierung von Biokatalysatoren (B = Biokatalysator; C = Träger) nach [Hartmeier, 1985]

2.5.1. Adsorption

Die adsorptive Trägerbindung ist die älteste und einfachste Immobilisierungsmethode. Ein Enzym kann mit dem Trägermaterial auf verschiedene Art und Weise wechselwirken, ohne dass kovalente Bindungen ausgebildet werden. Dazu gehören neben elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen geladenen Gruppen des Enzyms und des Trägers [Mateo et al., 2000 & 2007] auch Säure-Base-Wechselwirkungen [MacArio et al., 2007]. Die Enzyme werden an anorganische (poröses Glas, Alumosilikate, Tone) oder organische Träger (Polysaccharide, wie z.B. Cellulose und Agarose, synthetische Polymere, wie z.B. Polyacrylate und Polyester) gebunden [Hartmeier, 1986; Messing, 1976; Woodward, 1985]. Diese Methode der Immobilisierung ermöglicht hohe Restaktivitäten, weil durch die vergleichsweise schwachen Wechselwirkungen die Tertiärstruktur des Proteins nur wenig beeinflusst wird, wie es bei der kovalenten Immobilisierung der Fall ist [Albayrak und Yang, 2002; Sharma und Yamazaki, 1984]. Änderungen im pH-Wert, der Ionenstärke oder der Temperatur können zur Desorption führen [Přenosil et al., 2000].

Außerdem bietet die Immobilisierung von Enzymen durch Adsorption die Möglichkeit, den Biokatalysator durch einfache Filtration zu recyceln.

Im Allgemeinen findet die Adsorption von Proteinen an Trägermaterialien in einem Zweiphasensystem statt. In der flüssigen Phase befindet sich das im Lösungsmittel gelöste Protein, die feste Phase wird durch das Trägermaterial gestellt. Als Lösungsmittel für das Protein werden Pufferlösungen unterschiedlicher Zusammensetzung verwendet.

Adsorptionsisothermen von Proteinen können nach der Langmuir-Gleichung (Gleichung 2.8) modelliert werden, wobei nicht alle Randbedingungen nach Langmuir (1916) wie:

- Adsorption ist vollständig reversibel und findet nur in einer einzelnen molekularen Schicht statt
- alle Adsorptionsplätze sind gleichwertig und
- es gibt keine Wechselwirkungen zwischen benachbarten Adsorptionsplätzen und den adsorbierten Teilchen

erfüllt sein müssen [Atkins, 2010; Masel, 1996]. Der Hill-Parameter spiegelt Abweichungen vom Langmuir-Verhalten wider.

$$q^* = \frac{q_{\max} \cdot K_L \cdot c_{\text{eq}}^n}{1 + K_L \cdot c_{\text{eq}}^n} \quad (2.8)$$

Für Systeme, bei denen die Adsorptionseenthalpie logarithmisch mit der Belegung abnimmt, hat sich die empirisch gefundene Freundlich-Isotherme bewährt (Gleichung 2.9) [Atkins, 2010; Masel, 1996].

$$q^* = K_F \cdot c_{\text{eq}}^{\frac{1}{m}} \quad (2.9)$$

mit: q^* = Beladung des Adsorbents [$\text{g}_{\text{adsorbiert}} \text{g}_{\text{Träger}}^{-1}$]

q_{\max} = maximal adsorbierbare Konzentration des Adsorbents [$\text{g}_{\text{adsorbiert}} \text{g}_{\text{Träger}}^{-1}$]

c_{eq} = Konzentration des Adsorbats in Lösung

K_L = Langmuir Koeffizient [$\text{g}_{\text{Träger}} \text{g}_{\text{adsorbiert}}^{-1}$]

K_F = Freundlich Koeffizient [1]

m = Freundlich-Exponent [1]

n = Hill-Parameter, für Langmuir: $n=1$ [1]

2.5.2. Matriceinhüllung

Eine weitere bevorzugte Immobilisierungsmethode ist der Einschluss des Biokatalysators in einer Matrix. Vorteile dieser Methode sind neben ihrer Einfachheit auch ihr Potenzial zur Erhaltung der Enzymaktivität aufgrund milder Reaktionsbedingungen sowie guter Massentransfercharakteristika insbesondere bei kleinen Molekülen [Buchholz et al., 2005]. Polymere Matrizen werden durch das Dispergieren der katalytischen Komponenten (lösliches oder nicht lösliches Enzympräparat) in ein flüssiges Medium (Polymerlösung) und die anschließende Polymerisation hergestellt. Als Gelmaterialien werden vor allem Polyacrylamide (Polymerisation), Alginat oder Chitosan (ionotrope Gelbildung) oder Agarose (Präzipitation) verwendet. Durch das Verhältnis der Monomere (z.B. Acrylamid) zum Anteil des Quervernetzlers können die Porengröße und die mechanischen Eigenschaften des Gels bestimmt werden [Přenosil et al., 2000].

Bei der Auswahl geeigneter Gelmaterialien spielen vor allem folgende zwei Voraussetzungen eine große Rolle:

1. Rückhaltung der Enzyme in der Matrix
2. ungehinderter Durchlass der Reaktanden

In Tabelle 2.1 sind Porengrößen verschiedener Hydrogele dargestellt.

Tab. 2.1 Porengrößen verschiedener Matrizen

Matrix	Porengröße [nm]	Literaturquelle
1 % Alginat	17	Park und Chang, 2000
2-3 % Alginat	8-15	Stewart und Swaisgood, 1993; Klein et al., 1983
1 % Agarose	100	Righetti et al., 1981
2 % Agarose	48	Park und Chang, 2000
3,5 % κ -Carrageen	~4-10	Tosa et al., 1979
2 % Chitosan / 2 % Xanthan	80-150	Chu et al., 1998

Gelkugeln können hergestellt werden, indem das Biokatalysator-Polymer-Gemisch durch eine Düse in eine Vernetzerlösung getropft wird. Prüße et al. (1998) entwickelten mit dem sogenannten „Jet-Cutter“ Prozess eine Methode, die es ermöglicht, die Größe der Alginatkugeln zu kontrollieren.

Die Immobilisierung von Enzymen in Matrices birgt grundsätzlich die Gefahr, dass Diffusionslimitierung auftreten kann. Begründung dafür ist zum einen die Entfernung des Enzyms zum umgebenden Substrat und zum anderen die Maschenweite der Matrix, die einen bedeutenden Einfluss auf den Austausch von hochpolymeren Produkt- und Substratmolekülen zwischen Immobilisat und Reaktionsmedium hat. Die Grundgleichungen zur Beschreibung von Diffusionsprozessen sind die Fickschen Gesetze. Ist die Konzentration der diffundierenden Komponente eine Funktion von Zeit und Ort, wird das zweite Ficksche Gesetz verwendet [Atkins und de Paula, 2010]. Für den Fall der Diffusion des Substrates in oder aus einer kugelförmigen Perle ergibt sich mit den Randbedingungen (Gleichung 2.10 und 2.11) Gleichung 2.12:

$$c_t = c_0 \neq 0 \quad \text{für } 0 < r < r_0 \quad \text{und } t = 0 \quad (2.10)$$

$$c_t = c_\infty \neq 0 \quad \text{für } r = r_0 \quad \text{und } t > 0 \quad (2.11)$$

$$\frac{c_t - c_\infty}{c_0 - c_\infty} = \frac{6}{\pi^2} \cdot \sum_j \frac{1}{j^2} \cdot \exp\left(\frac{-j^2 \cdot \pi^2 \cdot D_{\text{eff}} \cdot t}{r^2}\right) \quad (2.12)$$

Nach Logarithmieren ergibt sich schließlich die Näherungslösung zu Gleichung 2.13, aus der der effektive Diffusionskoeffizient D_{eff} bestimmt werden kann.

$$\ln\left(\frac{c_t - c_\infty}{c_0 - c_\infty}\right) \approx -\left(\frac{\pi^2 \cdot D_{\text{eff}}}{r_0^2}\right) \cdot t + \text{const.} \quad (2.13)$$

Zur Beurteilung des immobilisierten Biokatalysators ist das Verhältnis zwischen Stofftransport und biochemischer Reaktion eine wesentliche Frage. Bei einer langsam verlaufenden biochemischen Reaktion und schnellem Stofftransport spielt die Stofftransportlimitierung nur eine untergeordnete Rolle. Verläuft die biochemische Reaktion jedoch schnell und der Stofftransport ist limitiert, kann eine Stofftransportkontrolle erwartet werden. Der Thiele-Modul definiert einen Parameter, der die beiden Größen zueinander ins Verhältnis setzt. Damköhler (1937) führte den Thiele-Modul für heterogene Katalysatoren ein. Er beschreibt das Verhältnis von maximaler Umsetzung im Biokatalysator und maximalen Stofftransport zum Biokatalysator [Buchholz, 1989; Buchholz et al., 2005].

Je nach Reaktionsordnung und Biokatalysatorgeometrie ergibt sich formal eine andere Definition für den Thiele-Modul. Doran (1995) liefert eine Zusammenstellung von Gleichungen. Für ein kugelförmiges Partikel ergibt sich der Thiele-Modul bei einer Reaktion erster Ordnung nach Gleichung 2.14:

$$\Phi = \frac{d}{6} \cdot \sqrt{\frac{r_{\text{max, sol}}}{K_M \cdot D_{\text{eff}}}} \quad (2.14)$$

Mit Hilfe des Thiele-Moduls ist eine Aussage möglich, ob die Berücksichtigung einer Stofftransportlimitierung nötig ist oder nicht. Allerdings kann damit nicht die Größe der Limitierung ermittelt werden. Dafür ist die Definition des Wirkungsgrades η notwendig. Der Katalysatornutzungsgrad eines kugelförmigen Partikels ergibt sich zu (Gleichung 2.15):

$$\eta = \frac{r_{\text{eff}}}{r_{\text{gelöst}}} = \frac{3}{\Phi} \cdot \left(\frac{1}{\tanh \Phi} - \frac{1}{\Phi}\right) \quad (2.15)$$

- mit: Φ = Thiele-Modul [1]
 η = Katalysatornutzungsgrad [1]
 K_M = Michaelis-Menten-Konstante [M]
 r = Reaktionsrate [$M s^{-1}$]
 d = Partikeldurchmesser [m]
 D_{eff} = effektiver Diffusionskoeffizient [$m^2 s^{-1}$]

Er setzt die beobachtete Reaktionsrate ins Verhältnis zu der Reaktionsrate, die ohne eine Stofftransportlimitierung zu erwarten gewesen wäre [Buchholz et al., 2005; Doran, 1995]. Gleichung 2.15 berücksichtigt jedoch keine Stofftransportlimitierung in der Grenzschicht um einen Biokatalysator. Hierzu sei auf die Literatur verwiesen [Bailey und Ollis, 1986, Doran, 1995].

Die innerhalb des Biokatalysators auftretenden negativen Effekte einer Stofftransportlimitierung lassen sich durch verschiedene Maßnahmen vermindern [Pörtner, 2006a]:

- beobachtete Reaktionsrate verkleinern (z.B. durch Verringerung der Enzym- oder Biomassekonzentration)
- Größe (Dicke, Durchmesser) des Biokatalysators verringern
- Substratkonzentration an der Oberfläche des Biokatalysators erhöhen

2.6. Downstream-Processing

Einen wichtigen Bereich der modernen Biotechnologie stellt das Downstream Processing, d.h. die Aufarbeitung von Produkten aus Kulturüberständen, aus Reaktionslösungen oder aus nachwachsenden Ressourcen, dar. Es steht eine Vielzahl verschiedener Aufarbeitungsmethoden, wie z.B. Chromatographie-, Extraktions-, Filtrations- und Membranadsorberverfahren, zur Verfügung. Mit bis zu 80 % der Herstellungskosten ist die Reinigung biotechnologischer Produkte einer der kostentreibenden Faktoren in der Produktion [Farid, 2008; Gottschalk, 2006; Jagschies und O'Hara, 2007]. Daher sind die Wahl der jeweils geeigneten Methode sowie die Optimierung des Verfahrens wichtige Aspekte der aktuellen Forschung.

2.6.1. Chromatographie

Die Chromatographie ist ein Trennverfahren, bei dem ein Stoffgemisch mittels unterschiedlicher Verteilung der Komponenten zwischen der stationären (unbewegliche Phase = Adsorber) und der mobilen (bewegliches Stoffgemisch = Adsorbent) Phase aufgetrennt wird.

Sie dient zum einem dem Nachweis und der Quantifizierung von Stoffen (analytische Chromatographie) und zum anderem der Isolierung von Stoffen (präparative Chromatographie).

Die Chromatographie kann nach:

1. dem Trennprinzip (Adsorptions-, Affinitäts-, Ionenaustausch-, Gel-Permeations-, ...)
2. den verwendeten Phasen (Flüssig-, Gas-)

eingeteilt werden.

2.6.1.1. Trennprinzipien der Chromatographie

Bei der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Flüssigchromatographien stehen folgende Interaktionsprinzipien im Vordergrund [Chmiel, 2011; Reif und Scheper, 2006; Schwedt, 1994]:

- Bei der **Adsorptionschromatographie** erfolgt die Trennung aufgrund der unterschiedlichen Adsorption der Stoffe an eine stationäre Phase. Organische Adsorbentien sind z.B. Polymere (basierend auf Polystyroldivinylbenzol) und anorganische Adsorbentien z.B. Kieselgel (Silicagel), Aluminium- oder Magnesiumoxid. Die Adsorption ist auf aktive Stellen zurückzuführen (stationäre Phase: Kieselgel; aktive Stellen: Silanolgruppen (SiOH)). Ein zweiter wichtiger Faktor ist die mobile Phase, da das zu trennende Molekül nur adsorbiert werden kann, wenn dessen Wechselwirkung mit dem Adsorbens größer ist als diejenige der mobilen Phase.

- Die **Ionenaustauschchromatographie** stellt eine spezielle Art der Adsorptionschromatographie dar, die eine Trennung geladener Spezies ermöglicht. Der Trenneffekt basiert auf elektrostatischen Wechselwirkungen. Gängige Ionenaustauschharze sind synthetische Polymere oder modifizierte Dextrane und Cellulosematerialien. Diese tragen Anionen- oder Kationenaustauschgruppen. Typische kationische Gruppen für Anionenaustauscher sind quartäre oder tertiäre Amine. Kationenaustauscher tragen z.B. Sulfonsäure- bzw. Carboxygruppen. An diese Austauschgruppen binden die einzelnen geladenen Komponenten eines zu trennenden Gemisches. Durch eine Änderung des pH-Wertes oder der Ionenstärke der mobilen Phase können die Komponenten eluiert werden.
- Bei der **Gel-Permeations-Chromatographie** (Größenausschlusschromatographie, auch Molekularsiebchromatographie, Gelfiltration oder Size-Exclusion Chromatographie SEC) erfolgt die Trennung durch Klassierung nach der Molekülgröße. Mikroporöse Partikel (Gele) bilden die stationäre Phase, durch deren Porendurchmesser bestimmt wird, welche Stoffe in die Pore diffundieren können und damit eine verlängerte Verweilzeit im durchströmten Festbett haben als die Stoffe, die zu groß für eine Diffusion in die Pore sind (Abbildung 2.12). Es existieren eine Vielzahl an Trenngelen (z.B. Polyacrylamid, Agarose, Dextrane, Vinylpolymere ...).

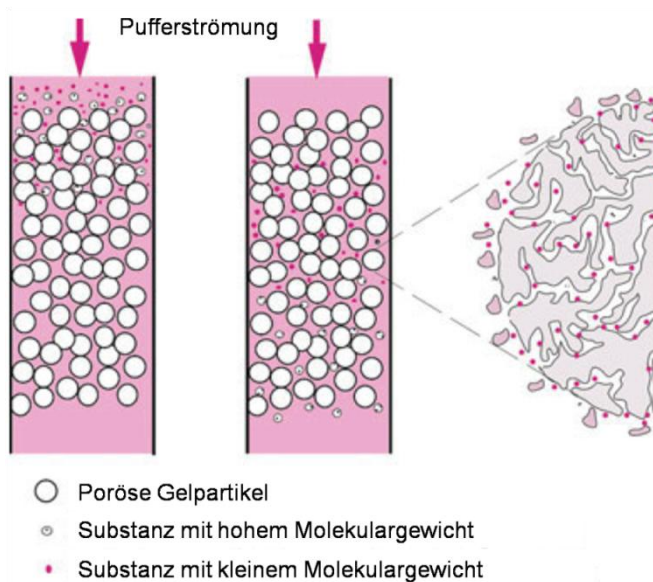


Abb. 2.12 Schema der Gel-Permeations-Chromatographie [Chmiel, 2011]

2.6.1.2. Kenngrößen der Säulenchromatographie

Für die Beurteilung der Trennung der Komponenten werden im Folgenden grundlegende Parameter beschrieben.

Um die Trennung eines Stoffgemisches nach dem Verlassen einer präparativen Trennsäule beurteilen zu können, werden entweder:

A) die mobile Phase mittels eines Detektors überprüft,

oder

B) die Fraktionen des Trennprozesses mittels HPLC (High Performance Liquid Chromatography, hier: HPAEC: High Performance Anion Exchange Chromatography) untersucht

Dabei werden die Komponenten aufgrund ihrer physikalischen oder chemischen Eigenschaften (abhängig vom verwendeten Detektionsprinzip) als Peaks in einem Chromatogramm erfasst. Aus diesem können verschiedene qualitative und quantitative Informationen der zu trennenden Substanzen entnommen werden (Abbildung 2.13) [Chmiel, 2011].

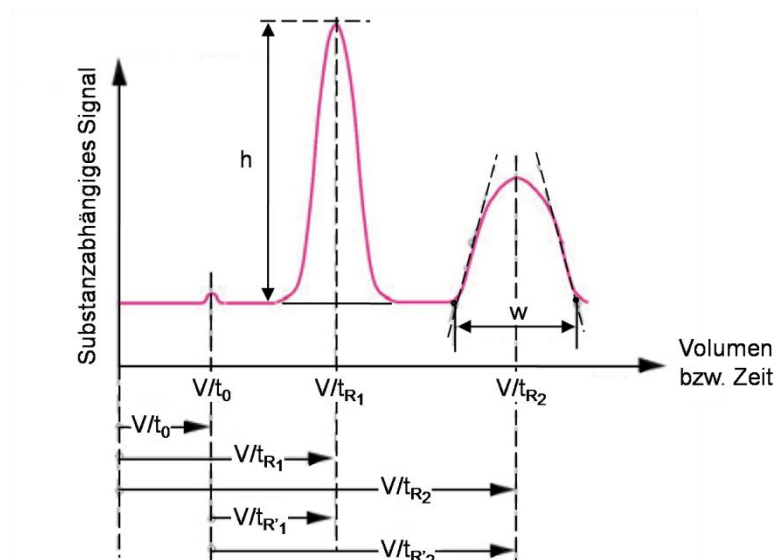


Abb. 2.13 Chromatogramm und seine Kenngrößen [Chmiel, 2011]. V/t_0 = Totvolumen/-zeit; w = Basisbreite eines Peaks; V_{Ri} = Retentionsvolumen/-zeit der Substanz i ; $V_{R'i}$ = Nettoretentionsvolumen/-zeit der Substanz i ($V_{R'i} = V_{Ri} - V_0$ bzw. $t_{R'i} = t_{Ri} - t_0$)

Peakfläche bzw. Höhe

Die Menge der gemessenen Komponente ist proportional zur Fläche unterhalb des Peaks (oft auch zur Höhe h über der Basislinie). Die Konzentrationen der Substanzen können ermittelt werden, indem der Detektor mit Lösungen bekannter Konzentration kalibriert wird. Alternativ wird zur quantitativen Bestimmung auch das Produkt aus Höhe und Halbwertsbreite verwendet.

Retentionszeit t_{Ri}

Die Zeit, die eine Substanz i benötigt von der Probenaufgabe $t=0$ (t_0) bis zur Detektion des Peakmaximums, wird als Retentionszeit bezeichnet. Diese qualitative Information ermöglicht die Identifizierung einer Substanz.

Totzeit t_0 (Durchflusszeit)

Die Retentionszeit, die eine nicht zurückgehaltene Substanz benötigt, heißt Totzeit.

Nettoretentionszeit $t_{R'i}$

Die Nettoretentionszeit ist die Differenz aus t_{Ri} und t_0 , wodurch die Aufenthaltszeit der Komponenten ausschließlich innerhalb der stationären Phase angegeben wird.

Basisbreite w

Die Basisbreite des Peaks dient zur Berechnung von weiteren Kennzahlen der Chromatographie.

Kapazitätsfaktor K'

Bei dem Kapazitätsfaktor handelt es sich um eine reduzierte, von den Säulendimensionen unabhängige, Größe, die sich aus den Kennzahlen aus Abbildung 2.13 wie folgt ergibt (Gleichung 2.16):

$$K' = \frac{V_{R'}}{V_0} = \frac{V_R - V_0}{V_0} \quad (\text{analog für } t) \quad (2.16)$$

Zwei Substanzen werden nur dann getrennt, wenn deren Elutionsvolumina/-zeiten und damit deren Kapazitätsfaktoren unterschiedlich sind.

Selektivitätsfaktor α (Trennfaktor, relative Retention)

Der Selektivitätsfaktor stellt ein Maß für die Trennfähigkeit einer Chromatographiesäule dar (Gleichung 2.17).

$$\alpha = \frac{K'_2}{K'_1} = \frac{V_{R2} - V_0}{V_{R1} - V_0} \quad (\text{analog für } t) \quad (2.17)$$

Für $\alpha = 1$ ist eine Trennung nicht möglich, da es zwischen den Komponenten keinen thermodynamischen Unterschied gibt. Für $\alpha = 1,5$ ist der Unterschied zwischen den Komponenten ausreichend, um eine gute Trennung zu erzielen. Für $\alpha > 1,5$ ist der Trennerfolg gleich dem bei $\alpha = 1,5$, allerdings ist der Zeitaufwand höher.

Auflösung R

Sie beschreibt die Trennschärfe zwischen zwei benachbarten Peaks bzw. die Güte der Trennung von zwei Komponenten (Gleichung 2.18).

$$R = 2 \cdot \frac{V_{R2} - V_{R1}}{w_{\text{Basis},2} + w_{\text{Basis},1}} \quad (\text{analog für } t) \quad (2.18)$$

Um eine ausreichend gute Trennung zu erzielen, muss der Wert für R zwischen 1,5 und 2 liegen. Für $R < 1,5$ ist die Trennung nicht vollständig und für $R = 0$ werden beide Komponenten gemeinsam eluiert.

Aufreinigungsfaktor F

Ein weiteres Maß zur Beurteilung der Trenngüte ist der Aufreinigungsfaktor F, der im einfachsten Fall der Quotient aus der Reinheit des Produktes und der Reinheit des Substrates sein kann (Gleichung 2.19).

$$F = \frac{\text{Reinheit der zu trennenden Substanz}_{\text{Fraktion}}}{\text{Reinheit der zu trennenden Substanz}_{\text{Stoffgemisch}}} \quad (2.19)$$

Nach einer erfolgreichen Aufreinigung ist $F > 1$. Abhängig vom Ausgangsgemisch sind auch höhere Werte für F möglich, beispielweise, wenn die Zielsubstanz A zu 0,8 % im Ausgangsgemisch vorliegt und nach der Trennung eine Reinheit von 96 % aufweist. Daraus ergibt sich ein Aufreinigungsfaktor von 120.

2.6.2. Zeolithe

Zeolithe sind nach der Definition von Breck (1964) kristalline, hydratisierte Alumosilikate mit einer dreidimensionalen Gerüststruktur, die Alkali- bzw. Erdalkalitionen enthalten. Sie kommen in der Natur vor, können aber auch synthetisch hergestellt werden. Aufgrund der Vielfalt ihrer möglichen Gerüststrukturen finden Zeolithe eine breite Anwendung in vielen Wirtschaftszweigen als z.B. effektive Ionenaustauscher, Adsorbentien und Katalysatoren [Puppe, 1986]. Die primären Baueinheiten einer Zeolithgerüststruktur sind die über Sauerstoffatome miteinander eckenverknüpften $(\text{AlO}_{4/2})^-$ - und $(\text{SiO}_{4/2})$ -Tetraeder. Diese können zu sekundären Bausteinen bzw. Polyedern und damit resultierend zu Tertiärstrukturen zusammengesetzt werden [Barrer, 1978; Breck, 1964; Meier, 1968]. Dadurch entstehen Poren und Kanäle, die frei bewegliche Metallkationen M^{n+} sowie Wassermoleküle enthalten, die die negative Ladung des Anionengerüsts neutralisieren. Daraus kann die chemische Zusammensetzung der Zeolithe mit folgender allgemeinen Summenformel (Gleichung 2.20) beschrieben werden [Breck, 1964]:



Abbildung 2.14 zeigt beispielhaft die Gerüststruktur eines BEA-Zeoliths.

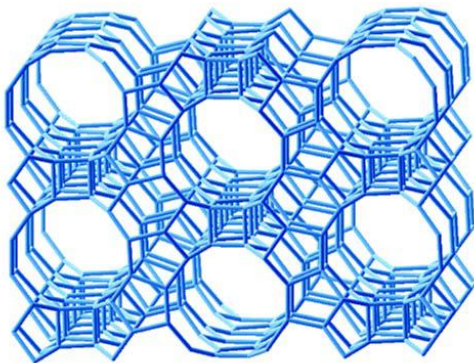


Abb. 2.14 Quartärstruktur des BEA-Zeoliths [Woltz, 2005]

Die aktuelle Zeolith-Datenbank umfasst insgesamt 197 (Stand: 04.03.2011) Strukturtypen, davon kommen ca. 40 in der Natur vor [Database of Zeolite Structures]. Unterschiede zwischen den einzelnen Zeolith-Typen sind ihre räumliche Struktur und das Verhältnis von Aluminium- und Siliziumatomen. Die Poreneingangsöffnungen der Zeolithe liegen im Bereich von 0,3 bis 1 nm. Somit können nur Moleküle die Poren passieren, deren sogenannter kinetischer Durchmesser entsprechend klein ist. Größere Moleküle sind am Eintritt in den

Kristall sterisch gehindert. Diese sterische Selektivität bewirkt den Molekularsiebeffekt, weshalb Zeolithe auch Molekularsiebe genannt werden [Bathen und Breitbach, 2001]. Die Entwicklung neuer Synthesewege durch Mobil Oil Corporation führte zu neuartigen oberflächenreichen Materialien vom Typ MCM-41 (Mobile Composition of Matter) mit Porendurchmessern von 1,5 bis über 10 nm [Kresge, et al., 1992].

Eine wichtige Charakterisierungsgröße für Zeolithe stellt das Si:Al-Verhältnis dar, das nach Löwenstein (1954) immer größer eins sein muss. Diese sogenannte Löwenstein-Regel besagt, dass niemals Al-O-Al-Gruppierungen auftreten. Alternativ zum Si:Al-Verhältnis, das ein atomares Verhältnis üblicherweise ohne Einheit widerspiegelt, wird häufig das Modul, welches das molare Verhältnis von SiO₂ zu Al₂O₃ in der Einheit mol mol⁻¹ angibt (Gleichung 2.21), verwendet.

$$\text{Modul M} = \frac{n_{\text{SiO}_2}}{n_{\text{Al}_2\text{O}_3}} = 2 \cdot \frac{n_{\text{Si}}}{n_{\text{Al}}} \quad (2.21)$$

Demnach entspricht das Modul dem doppelten Wert des Si:Al-Verhältnisses. Eine Erhöhung des Si:Al-Verhältnisses bewirkt die Abschwächung der polaren Oberflächeneigenschaften, wodurch der Zeolith zunehmend hydrophober wird. Die Aufnahme von Wasser wird geringer und apolare Substanzen werden adsorbiert [Anderson und Klinowski, 1986; van Bekkum und Kouwenhoven, 1989].

Für das in Alginat immobilisierte Enzym Dextranucrase wurde ein optimales Reaktionssystem zur Produktion des Disaccharids Isomaltose (Donor: Saccharose, Akzeptor: Glucose) ermittelt, welches im Rahmen des SFB 578 etabliert werden konnte. In diesem werden geeignete Zeolithe eingesetzt, die mit dem Substrat als Suspension durch den Reaktor fließen und zur hochspezifischen Adsorption des Produktes in der Lage sind [Berensmeier und Buchholz, 2004; Ergezinger, 2005; Ergezinger et al., 2005; Jördening et al., 2005].

3. Zielsetzung der Arbeit

Das Zauberwort der Ernährungsbranche heißt „Functional Food“. Darunter versteht man Nahrungsmittel oder Nahrungsmittelbestandteile der verschiedensten Produktkategorien, die neben dem rein kalorischen einen zusätzlichen, der Gesundheit fördernden Wert besitzen. Eine besondere Rolle dabei spielen die Reduktion von Krankheitsrisiken und die Prävention von Krankheiten. Bei den Zusatzstoffen handelt es sich vor allem um Vitamine (z.B. Vitamin C und E), Mineralstoffe (z.B. Iod, Magnesium, Eisen, Calcium), Bakterienkulturen (probiotische Milchsäurebakterien wie z.B. *Lactobacillus casei*), ungesättigte Fettsäuren (z.B. Omega-3-Fettsäuren) und Präbiotika (z.B. Inulin, Oligofructose).

Seinen Ursprung hat der Trend zu „Functional Food“ in Japan und gelangte über die USA allmählich nach Europa.

Im Gegensatz zu Probiotika, die lebende Mikroorganismen enthalten, um positive gesundheitliche Effekte zu erzielen, handelt es sich bei Präbiotika um unverdauliche Oligo- und Polysaccharide, also Kohlenhydrate, die von den menschlichen Verdauungssäften nicht aufgeschlossen werden können. Sie fördern die Vermehrung der gesundheitsfördernden Bakterien wie *Lactobacilli* und *Bifidobacteria* [Gibson und Roberfroid, 1995; Jenkins et al., 1999; Rastall und Hotchkiss, 2003; Yun, 1996]. Zu den EU freigegebenen Präbiotika zählen z.B. Inulin und Oligofructose.

Neben ihrem Einsatz als Präbiotika finden sie bereits in vielen kommerziellen Produkten der kosmetischen Industrie Anwendung (z.B. Hyaluronsäure) [Lautenschläger, 2009; Sutherland, 1998]. Außerdem werden immer mehr Möglichkeiten zur Anwendung in der pharmazeutischen Industrie beschrieben, wie z.B. antibakterielle und antivirale Impfstoffe und Therapeutika z.B. gegen Krebs [Ghazarian, 2011; Macmillian und Daines, 2003; Pool-Zobel, 2005; Seeberger und Werz, 2007; Taper und Roberfroid, 2000].

Die biotechnologische Produktion von Oligosacchariden, insbesondere für den Food- und Pharmabereich, gewinnt zunehmend an Bedeutung.

Im Rahmen des Verbundprojektes 1 „Lebensmittelnetzwerk Niedersachsen – Vom hochwertigen Rohstoff zur gesunden Ernährung“ des FAEN (Forschungsverbund Agrar- und Ernährungswissenschaften Niedersachsen) sollten in der vorliegenden Arbeit aus Saccharose als Fructosylquelle durch eine enzymatische Transformation mittels einer

Fructosyltransferase und geeigneten Akzeptoren (Galacturonsäure, Xylose, Isomaltulose) neue Oligosaccharide produziert werden. Dazu sollten sowohl enzymatische Verfahren in Lösung entwickelt werden als auch die präparative Gewinnung durch integrierte Synthese und Produktaufarbeitung im kontinuierlichen Verfahren.

Hierzu waren folgende Aspekte:

- Screening nach einer geeigneten Fructosyltransferase
- kinetische Untersuchungen der gewählten Fructosyltransferase
- Immobilisierung der Fructosyltransferase
- reaktionsintegrierte Abtrennung des Produktes

zu untersuchen und gegebenenfalls zu optimieren.

4. Material und Methoden

4.1. Chemikalien und Geräte

4.1.1. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen BioRad (München/ Deutschland), Fluka (Sigma Aldrich, München/ Deutschland), Merck (Darmstadt/ Deutschland), Purolite (Llantrisant, Wales/ UK), Riedel-de Haën (Seelze/ Deutschland) oder Carl Roth (Karlsruhe/ Deutschland) bezogen.

4.1.2. Geräte

Autoklav	Sauter Sterico Systec	HS1 FD Vapoklav 4E VE-150
Chromatographiekühlschrank Fraktionensammler	Uniequip Büchi Büchi Pharmacia Gilson	Unichromat 700 684 C-660 Frac-100 FC-206
<u>HPAEC</u>		
Pumpe:	Dionex	Gradient Pump , GPM-2
Autosampler:	Perkin Elmer	Series 200
Vorsäule:	Dionex	CarboPac PA1, 50x4 mm
Hauptsäule:	Dionex	CarboPac PA1, 250x4 mm
Detektor:	Dionex	Modell PAD-2
	Dionex	ICS-3000
Software:	DataApex Dionex	Clarity Chromeleon
<u>HPLC</u>		
Pumpe:	Metrohm	697 IC Pump
Autosampler:	Glynkotek	Marathon
Säule:	Phenomenex	Rezex RCM Mono- saccharide Ca ⁺
Säulenofen:	Varian	MetaTherm
Detektor:	Shimadzu	RID-6A, RI-Detektor
Software:	DataApex	Clarity
<u>HPLC</u>		
Pumpe:	SFD	SDS 9404
Autosampler:	Marathon	Spark Holland
Säule:	YMC	Polyamine II; 150x4,6
Säulenofen:	Varian	MetaTherm
Detektor:	Shodex	RI-101
Software:	Data Apes. Ltd.	Andromeda V.1.7 DLL

Magnetrührer	IKAMAG	Ret, Rco
<u>pH-Messgeräte</u>		
pH-Meter:	WTW	pH 315i
	Greisinger electronic	GMH 3530
pH-Elektrode:	WTW	Sen Tix 41
	Greisinger electronic	
Photometer	Beckman Coulter	DU-65
	Jenway	6315
Pumpen	B. Braun	FE211
	Gilson	Bimed Minipuls 2
	Verder	VRX
	Watson-Marlow	503 S
	Watson-Marlow	503 U
Rotator	Labor-Brand	L-28
Schüttelwasserbad	GFL	1083
Schüttelinkubator	GFL	3033
<u>SDS-PAGE</u>		
Gelsystem:	Bio-Rad	Mini-PROTEAN® II Cell
Spannungsgerät:	Amersham Biosciences	Electrophoresis Power Supply EPS 301
Sicherheitswerkbank	Heraeus	Lamin Air HLB 2448
Thermostat	Julaba	FB40 ; V
	Lauda	Mgw RC3 Thermostar
	B. Braun	Thermomix BU
Thermoheizblock	HLC	MHR23 mit BM2, BM15, BM50
	HLC	HTMR-131
Trockenschrank	Heraeus	548
	Memmert	INE 600; BE 30; B 10
Ultraschallgerät	Bandelin	Sonopuls HD2070; Sonotrode MS72
Vortexer	IKA	Genius 3
	VWR	VV3
Waagen	Sartorius	R 160P; L 2200S; BP 301S; M-Power; IB31000P-000D002
<u>Zentrifugen</u>		
Kühltischzentrifuge:	Heraeus	Biofuge 22R; Rotor: HFA 14.94 3743
	ThermoScientific – Heraeus	Fresco21; Rotor: 75003424
	Eppendorf	5804R; Rotor: F-34-6-38
Kühlzentrifuge:	Beckman	JS-21; Rotor: JA-10
	Beckman Coulter	Avanti J-E; Rotor: JA-10
Tischzentrifuge:	Eppendorf	Minispin

4.2. Mikro- und makromolekulare Grundlagen

4.2.1. Bakterienstämme

In Tabelle 4.1 sind die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme zusammengefasst.

Tab. 4.1 Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Charakteristika	Quelle
<i>Escherichia coli</i> BL 21 (DE3)	F ⁻ dcm ompT hsdS (rB ⁻ mB ⁻) gal λ(DE3)	Stratagene
<i>Bacillus megaterium</i> DSM319	Wildtyp	DSMZ
<i>Zymomonas mobilis</i> ATCC 39676		American Type Culture Collection (ATCC) als ATCC 39676

4.2.2. Bakterielle Plasmide

Tabelle 4.2 zeigt die eingesetzten Plasmide.

Tab. 4.2 Verwendete bakterielle Plasmide

Stamm	Charakteristika	Quelle
pET11d	Expressionsvektor, T7/lac-Promoter, amp ^r	Novagen
pRBec1	amp ^r , <i>sacB</i> von <i>Bacillus megaterium</i> ohne Signalsequenz in pET11d (kloniert durch <i>Bam</i> HI und <i>Nco</i> I)	Institut für Mikrobiologie, AK Prof. Dr. Jahn, TU Braunschweig [Biedendieck, 2007]

4.2.3. Stamm zur Herstellung der rekombinanten Fructosyltransferase

Für die Herstellung der rekombinanten Fructosyltransferase (Ftf) aus *Bacillus megaterium* *SacB* wurde der S1 Stamm *Escherichia coli* BL21 (DE3) (Firma Stratagene) verwendet.

Als Expressionsvektor diente das Plasmid pRBec1 (Tabelle 4.2). Dabei handelt es sich um ein Konstrukt, bei dem das Gen der Fructosyltransferase *SacB* aus *Bacillus megaterium* in den Vektor pET11d (Firma Novagen) kloniert wurde. Das Produkt des lacI-Repressor-Gens ermöglicht eine Induktion der Proteinexpression mittels Isopropyl-β-thiogalactopyranosid (IPTG). Des Weiteren ist, wie in Abbildung 4.1 dargestellt, ein Ampicillin-Resistenzgen auf dem Plasmid lokalisiert [Biedendieck, 2010].

Abb. 4.1 Plasmid pRBec1 für Expression der Ftf *SacB* aus *Bacillus megaterium* [Biedendieck, 2010]

4.3. Medien und Medienzusätze

Die verwendeten Medien werden für 20 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck dampfsterilisiert. Temperaturempfindliche Zusätze werden sterilfiltriert (0,2 µm Porendurchmesser). Für feste Medien werden den verschiedenen Medien 15 g L⁻¹ Agar hinzugefügt.

4.3.1. Luria-Bertani Medium (LB-Medium) (Kultivierung von *Escherichia coli* BL21 (DE3))

Pepton	10 g L ⁻¹
Hefeextrakt	5,0 g L ⁻¹
NaCl	5,0 g L ⁻¹

4.3.2. ATCC Medium: 1731 (Kultivierung von *Zymomonas mobilis* ATCC 39676)

Saccharose	150 g L ⁻¹
Hefeextrakt	2,0 g L ⁻¹
Pepton	2,0 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	2,0 g L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0 g L ⁻¹
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2,0 g L ⁻¹

➔ pH-Wert auf 7,0 einstellen

4.3.3. Abgewandeltes ATCC Medium [Crittenden und Playne, 2002] (Kultivierung von *Zymomonas mobilis* ATCC 39676)

Glucose	100 g L ⁻¹
Hefeextrakt	2,0 g L ⁻¹
Pepton	2,0 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	2,0 g L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0 g L ⁻¹
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2,0 g L ⁻¹

➔ pH-Wert auf 6,5 einstellen

4.3.4. Medienzusätze

Für die Expression der Fructosyltransferase werden dem LB-Medium (Kapitel 4.3.1.) folgende Medienzusätze hinzugefügt:

- Ampicillin (Amp): 0,5 mM
- IPTG: 0,5 mM

Beide Medienzusätze werden in einer 1000fach konzentrierten Stammlösung hergestellt und bei -20 °C gelagert.

Ampicillin-Stammlösung

Ampicillin-Natriumsalz 2 g

- ➔ in 10 mL deion. Wasser lösen
- ➔ steril filtrieren

IPTG-Stammlösung

Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid 1,2 g

- ➔ in 10 mL deion. Wasser lösen
- ➔ steril filtrieren

4.4. Mikro-/ molekularbiologische Techniken

4.4.1. Stammhaltung

Die Stammhaltung erfolgt in einer Kryokultur in 10 % Glycerinlösung bei -86 °C.

Für die Herstellung der Glystocks wird ein Reagenzglas mit 5 mL LB-Amp-Medium (für *Escherichia coli* BL21 (DE3)) bzw. 5 mL ATCC-Medium (abgewandelt; Kapitel 4.3.3.) mit 50 µL eines Glystocks angeimpft und bei 37 °C (für *Escherichia coli* BL21 (DE3)) bzw. 30 °C (für *Zymomonas mobilis* ATCC 39676) und 200 rpm für 24 h bzw. 48 h inkubiert. Anschließend werden 20 µL Zellen mit 80 µL Glycerin in sterile Eppis pipettiert und bei -86 °C gelagert.

4.4.2. Expression der rekombinanten Fructosyltransferase

Eine neue Fructosyltransferase aus *Bacillus megaterium* wurde von Dr. Rebekka Biedendieck aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dieter Jahn (Institut für Mikrobiologie, TU Braunschweig) identifiziert [Biedendieck, 2007]. Dieses Protein wird rekombinant mit *Escherichia coli* exprimiert.

Vorkultur:

In 100 mL Kolben mit Schikanen werden 50 mL LB-Amp-Medium mit 50 µL des Glystocks angeimpft und bei 37 °C und 180 rpm über Nacht (24 h) inkubiert.

Hauptkultur:

2 L Kolben mit Schikanen werden mit 500 mL LB-Amp-Medium befüllt und mit 50 mL der Vorkultur beimpft. Für 3 h werden die Kolben bei 37 °C und 160 rpm inkubiert. Nach 3 h wird die Expression von *SacB* durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert und für weitere 22 h bei 27 °C und 160 rpm inkubiert.

Zellernte:

Die Kulturlösung von einem 2 L Kolben wird auf zwei Zentrifugenbecher verteilt und bei 10.000 rpm (17.696 g) für 30 min bei 4 °C zentrifugiert (Beckman Coulter JS-21 bzw. Avanti J-E, Rotor JA-10). Nach dem Zentrifugieren wird der Überstand verworfen und das Pellet mit 50 mM Sörensenpuffer pH 6,6 gewaschen und wiederum für 30 min bei 10.000 rpm (17.696 g) und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen.

4.4.3. Zellaufschluss mittels Ultraschall zur Freisetzung der rekombinanten Fructosyltransferase und Aktivitätstest mit dem Zellextrakt

4.4.3.1. Lösungen und Puffer

Sörensenpuffer, 50 mM, pH 6,6

50 mM Na ₂ HPO ₄	34,7 %	(v:v)
50 mM KH ₂ PO ₄	65,3 %	(v:v)

DNS-Färbereagenz

3,5 Dinitrosalicylsäure	10 g L ⁻¹
Kaliumnatriumtartrat	300 g L ⁻¹
NaOH	16 g L ⁻¹

➔ dunkel (in Alufolie eingeschlagene Flasche) und bei 4 °C lagern

Reaktionsmedium für Aktivitätstest

Saccharose	0,5 M
------------	-------

➔ gelöst in 50 mM Sörensenpuffer, pH 6,6

4.4.3.2. Zellaufschluss

Das Pellet wird in 6,25 mL Sörensenpuffer (50 mM, pH 6,6) resuspendiert und in 50 mL Falconröhrchen überführt (ein Falcon für einen 2 L Kolben, also zwei Zentrifugenbecher in einem Falcon). Das Gesamtvolumen pro Falcon entspricht dann ca. 15 mL.

Der Zellaufschluss erfolgt mit Ultraschall mit den Aufschlussbedingungen: 4 min, 50 % Zeit, 70 % Leistung (Bandelin Sonopuls, Sonde MS 72). Der Aufschluss erfolgt auf Eis.

Die aufgeschlossenen Zellen werden bei 8.000 rpm (11.325 g) und 4 °C für 60 min abzentrifugiert. Der Überstand wird auf 2 mL Eppis verteilt und bei -20 °C aufbewahrt.

4.4.3.3. Aktivitätstest

Fructosyltransferasen katalysieren die Spaltung von Saccharose und Bildung von hochmolekularen Polysacchariden unter der Freisetzung von Glucose. Der quantitative Nachweis der Glucose kann sowohl enzymatisch als auch durch Oxidation im alkalischen Milieu erfolgen.

Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte anhand der chemischen Umsetzung mit Dinitrosalicylsäure (DNS). Dieser Test weist allgemein reduzierende Zucker nach, da die Reaktion an der freien Carbonylgruppe erfolgt [Miller et al., 1960]. Die Dinitrosalicylsäure wird reduziert, wodurch das Absorptionsmaximum von Dinitrosalicylsäure auf 540 nm verschoben wird (Abbildung 4.2). Bei dieser Reaktion ist ein Farbumschlag der Lösung von orangegelb nach rot zu beobachten. Dieser dient der photometrischen Detektion der freigesetzten Zucker mit reduzierenden Enden. Die Quantifizierung erfolgte anhand einer Glucose-Standardreihe im Bereich von 0 bis 2,0 g L⁻¹.

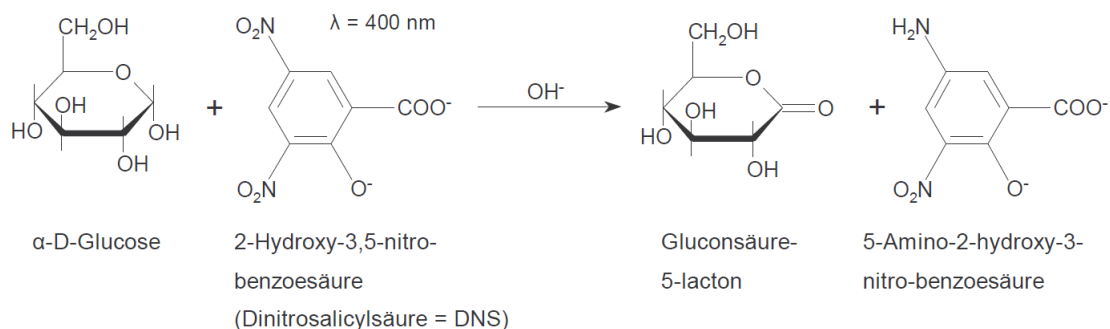


Abb. 4.2 Reaktion zum Nachweis von Aldosen nach Sawicki und Sawicki (1976)

Zur Bestimmung der Enzymaktivität im Zellextrakt wurde folgender Ansatz (Tabelle 4.3) verwendet:

Tab. 4.3 Reaktionsansatz zur Aktivitätsbestimmung: Enzymreaktion

0,5 M	Saccharose
40 μL	Enzymlösung
→ durchgeführt in Sörensenpuffer (50 mM, pH 6,6), bei 37 °C, im Thermoschüttelblock, Schüttelstufe 5	
→ Reaktionsvolumen: 2 mL	

Nach bestimmten Zeitintervallen ($t = 0, 5, 10, 20$ und 30 min) wurden Proben à $100 \mu\text{L}$ entnommen, für 15 min bei 96 °C im Thermoblock inaktiviert und anschließend auf Eis abgekühlt. Für die Bestimmung der freigesetzten Glucose wurde der DNS-Test wie folgt durchgeführt:

Tab. 4.4 Reaktionsansatz zur Aktivitätsbestimmung: DNS-Test

100 μL	Probe* bzw. Glu-Standard
100 μL	DNS-Reagenz
→ 10 min bei 96 °C im Thermoblock, abkühlen auf Eis	
1 mL	deion. Wasser
→ Vermessung bei 540 nm gegen den Nullwert einer Glucosekalibrierung	

* gegebenenfalls verdünnt

Die Versuche wurden als Doppelbestimmung durchgeführt. Die Enzymaktivität ergibt sich aus der linearen Zunahme der Glucosekonzentration, die aus der glycosidischen Spaltung der Saccharose resultiert. Die Enzymaktivität wurde nach Gleichung 4.1 ermittelt, wobei 1 U als die Enzymmenge definiert ist, die bei 37 °C und pH 6,6 die Bildung von $1 \mu\text{mol}$ Glucose pro Minute katalysiert.

$$\text{Aktivität [U mL}^{-1}] = \frac{c_{\text{Glucose}} \cdot V_{\text{Reaktionsansatz}}}{t_{\text{Inkubation}} \cdot V_{\text{Enzymlösung}}} \quad (4.1)$$

4.4.4. Analyse der rekombinanten Fructosyltransferase

4.4.4.1. Lösungen und Puffer

Bradford-Stammlösung

Coomassie Brilliant Blue G250	300 mg
Methanol	300 mL
Orthophosphorsäure	600 mL

➔ Coomassie Brilliant Blue in Methanol lösen und anschließend Orthophosphorsäure hinzufügen

Bradford-Reagenz (Gebrauchslösung)

Bradford-Stammlösung	150 mL
deion. Wasser	850 mL

➔ nach der Vermischung dreimal filtrieren, zweimal grob und einmal fein

Trenngel, 12 %ig (für 1 Minigel, $V_{\text{Gel}} = 4 \text{ mL}$)

deion. H_2O	1,3 mL
30 % Acrylamid	1,6 mL
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	1,0 mL
10 % SDS	40 μL
10 % APS	40 μL
TEMED	2 μL

Sammelgel, 4 %ig (für ein Minigel, $V_{\text{Gel}} = 1,5 \text{ mL}$)

deion. H_2O	1,0 mL
30 % Acrylamid	0,26 mL
1,0 M Tris-HCl, pH 6,8	0,2 mL
10 % SDS	15 μL
10 % APS	15 μL
TEMED	2 μL

Laemmli-Puffer (5x) [Laemmli, 1970]

Tris-HCl, pH 6,8	312	mM
Glycerin	5	mL
10 % SDS	3,6	mL
β -Mercaptoethanol	1,5	mL
Bromphenolblau	0,02	%

10xLaufpuffer, pH 8,3

Tris-Base	0,25	M
Glycerin	2,0	M
SDS	1,0	% (w:w)

➔ Lagerung: 4 °C

Färbelösung

Coomassie Brilliant Blue R250	0,05	%
Isopropanol	25	%
Essigsäure	10	%

Entfärberlösung

Essigsäure	10	%
------------	----	---

4.4.4.2. Proteinstandard

Als Proteingrößenstandard für die SDS-PAGE wurde der Precision Plus Protein Unstained Standard der Firma Bio-Rad (München) verwendet (Abbildung 4.3).

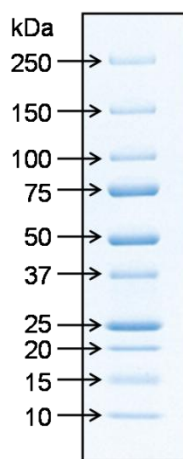


Abb. 4.3 Precision Plus Protein Unstained Standard (Bio-Rad/ München; Katalog #161-0363)

4.4.4.3. Proteinanalyse nach Bradford

Ein klassisches Verfahren zur Bestimmung des Proteingehaltes ist die Messung nach Bradford (1976). Als Nachweis für die Gesamtproteinmenge dient dabei der blaue Säurefarbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 (Abbildung 4.4). Dieser Farbstoff bildet mit vorhandenen Proteinen Komplexe. Die ungebundene (kationische) Form hat ein Absorptionsmaximum bei 470 nm (blau). Durch die Komplexbildung mit Proteinen wird der Farbstoff in seiner unprotonierten, anionischen Sulfatform stabilisiert und das Absorptionsmaximum verschiebt sich auf 595 nm (orange). Dabei bindet der Farbstoff unspezifisch an die Proteine und aufgrund der Färbung kann die Konzentration an enthaltenen Proteinen abgeschätzt werden.

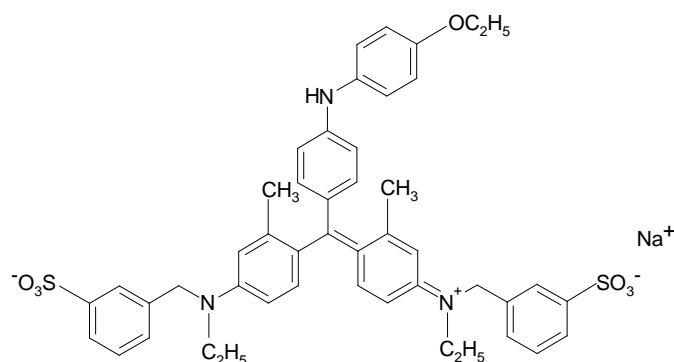


Abb. 4.4 Strukturformel von Coomassie Brilliant Blue G 250

Zur Messung des Proteingehaltes wurden 100 µL Probe (gegebenenfalls verdünnt) mit 5 mL Bradford-Gebrauchslösung vermischt und für 15 min bei 20 °C inkubiert. Danach wurde die Extinktion bei 595 nm gegen einen Blindwert mit 100 µL deionisiertem Wasser vermessen. Eine Kalibriergerade wurde mit bekannten Proteinkonzentrationen von 0 g L⁻¹ bis 0,5 g L⁻¹ BSA (Bovine Serum Albumin) erstellt.

4.4.4.4. Proteinanalyse durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfate-Polyacrylamidgel-Elektrophorese) ist ein einfaches und hochauflösendes Verfahren, um Proteine zu analysieren. Sie ist eine spezielle Form der Gelelektrophorese, mit deren Hilfe die Auftrennung eines Proteingemisches nur von der Masse der Proteine abhängig gemacht werden kann. Dieses wird durch den Zusatz des anionischen Tensids Natriumdodecylsulfat [H₃C-(CH₂)₁₀-CH₂SO₃⁻Na⁺] (SDS) erzielt, indem es die Proteine denaturiert, d.h. alle nichtkovalenten Bindungen innerhalb des Proteins werden

zerstört. Eine vollständige Proteindenaturierung wird durch die Zugabe von Thiolen (z.B. Mercaptoethanol) erreicht, wodurch die Disulfidbrücken gelöst werden. Durch die vielen negativ geladenen SDS-Moleküle bekommt das Protein eine stark negative Oberfläche, wodurch die eigentliche Ladung des Proteins somit vernachlässigbar klein wird. Die negative Oberfläche des Protein-SDS-Komplexes ist proportional zur Masse des jeweiligen Proteins, wodurch die Laufgeschwindigkeit in etwa als umgekehrt proportional zur Masse des wandernden Proteins angesehen werden kann. Genauere Untersuchungen ergaben, dass infolge der Molekularsiebeigenschaften des porösen Polyacrylamidgels die Beweglichkeiten der Proteine umgekehrt proportional zum \log_{10} der molaren Massen sind [Wilson und Goulding, 1991]. Eine Bestimmung der Molekularmassen der zu untersuchenden Proteine kann durch den Vergleich mit den Wanderungsgeschwindigkeiten von Proteinen bekannter Größe erfolgen.

Für die SDS-PAGE wurden ein 4 %iges Sammel- bzw. ein 12 %iges Trenngel (Kapitel 4.4.4.1) verwendet. Die Proteine im Gel wurden direkt nach der Gelelektrophorese mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blue angefärbt. Bei dieser Färbung werden die Proteine gleichzeitig über eine Ethanol-Essigsäure-Wasser-Mischung im Gel denaturiert und so fixiert. Die Nachweisempfindlichkeit liegt dabei zwischen 0,1-1 µg Protein.

Zur Denaturierung der Proteine werden 30 µL Probe mit 10 µL Ladepuffer (Laemlli-Puffer; Kapitel 4.4.4.1.) gemischt, kurz zentrifugiert und für 10 min bei 95 °C aufgeköcht.

Die Proben laufen bei 12 mA im Sammelgel und 15 mA im Trenngel. Der Lauf ist fertig, wenn das Bromphenolblau rausgelaufen ist (Dauer: ca. 45 min).

Für die Färbung wird das Sammelgel verworfen. Das Trenngel wird in einer Glasschale mit Färbelösung auf der Wippe inkubiert. Anschließend wird die Färbelösung verworfen und das Gel mit etwas Wasser gespült. Danach wird das Gel mit Entfärberlösung auf der Wippe inkubiert. Die Lagerung des Gels erfolgt in Wasser. Die Dokumentation erfolgt durch das Fotografieren und/ oder das Trocknen zwischen Cellophanpapier des Gels.

4.4.5. Kultivierung von *Zymomonas mobilis*

Für die Kultivierung von *Zymomonas mobilis* ATCC 39676 wurden zwei verschiedene Medien verwendet (siehe Kapitel 4.3.2. bzw. 4.3.3.).

Vorkultur:

In 100 mL Kolben mit Schikanen werden 50 mL ATCC-Medium mit *Zymomonas mobilis* Zellen von Agarplatten angeimpft und bei 30 °C und 180 rpm für mindestens 48 h inkubiert.

Hauptkultur:

2 L Kolben mit Schikanen werden mit 500 mL ATCC-Medium befüllt und mit 50 mL der Vorkultur beimpft und bei 30 °C und 160 rpm für mindestens 48 h inkubiert.

Zellernte:

Die Kulturlösung von einem 2 L Kolben wird auf zwei Zentrifugenbecher verteilt und bei 10.000 rpm (17.696 g) für 60 min bei 4 °C zentrifugiert (Beckman Coulter JS-21 bzw. Avanti J-E, Rotor JA-10). Nach dem Zentrifugieren wird der Überstand verworfen und die Zellen bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

4.5. Untersuchungen zur Produktbildung der Fructosyltransferase mit verschiedenen Akzeptoren

4.5.1. Fructosyltransferasen-Screening

Für die Suche einer geeigneten Fructosyltransferase steht eine Ftf-Bibliothek zur Verfügung (SFB 578; Institut für Mikrobiologie, AK Prof. Jahn, TU Braunschweig).

Folgende vier Fructosyltransferasen wurden hinsichtlich ihrer Eignung zur FOS-Produktion genauer untersucht. Die Fructosyltransferasen aus:

- *Bacillus subtilis* NCIMB 11871 (Wildtyp; Levansucrase; EC 2.4.1.10)
- *Bacillus subtilis* NCIMB 11871 (A5-Mutante: N242H; Levansucrase; EC 2.4.1.10)
- *Aspergillus niger* AB1.13 (Invertase; EC 3.2.1.26)
- *Bacillus megaterium* DSM 319 (Levansucrase; EC 2.4.1.10)

4.5.2. Untersuchungen zur Produktbildung mit der Fructosyltransferase *SacB* aus *Bacillus megaterium*

Alle Untersuchungen hinsichtlich der Produktbildung der Fructosyltransferase aus *Bacillus megaterium* DSM 319 mit den Akzeptoren Galacturonsäure, Isomaltulose und Xylose wurden bei 37 °C und pH 6,6 (Sörensenpuffer, 50 mM) durchgeführt.

Es wurden Proben nach unterschiedlichen Zeitintervallen entnommen und die Enzymreaktion sofort durch Erhitzen (15 min, 96 °C) gestoppt.

Tabelle 4.5 zeigt die Reaktionsansätze, die für die Untersuchung der Akzeptorenakzeptanz verwendet wurden.

Tab. 4.5 Reaktionsansatz für Produktbildungsuntersuchungen

0,3 M	Saccharose
0,6 M	Akzeptor
5 U mL ⁻¹ Reaktionsvolumen	Ftf-Lösung
→ 37 °C, pH 6,6 (Sörensenpuffer, 50 mM) im Thermoschüttelblock, Schüttelstufe 5	

4.5.3. Analyse der Akzeptorreaktionen

Die Analyse der Reaktionen der Fructosyltransferase mit Saccharose und den Akzeptoren erfolgte sowohl per Dünnschichtchromatographie (DC) (Kapitel 4.8.2.1.) als auch mittels HPAEC (Dionex; Kapitel 4.8.2.2.).

4.6. Immobilisierung der Fructosyltransferase

4.6.1. Lösungen und Puffer

Calciumchloridpuffer	200 mM
Natriumacetatpuffer	25 mM, pH 5,4
Calciumacetatpuffer	25 mM, pH 5,4

Na-Alginatlösung

Na-Alginatsalz	3,5 %
----------------	-------

→ in 25 mM Na-Acetate-Puffer pH 5,4, über Nacht bei 4 °C zum Entgasen rühren

4.6.2. Kovalente Bindung an Epoxyträger

Bei den Epoxyträgern Sepabeads® EC-EP (Resindion) handelt es sich um hydrophobe Polymethacrylate. Oberfläche und Poren des Trägers sind mit Epoxygruppen funktionalisiert. Durch diese Oxiangruppen kann das Enzym an mehreren Punkten gebunden werden, indem diese von den Aminogruppen des Proteins nucleophil angegriffen und kovalente Bindungen zu dessen Glutamin- und Lysinresten gebildet werden, wodurch es in seiner Struktur stabilisiert wird („multipoint covalent attachment“) [Mateo et al., 2006] (Abbildung 4.5). Des Weiteren sind die Rohmaterialien, die zur Herstellung des Trägers EC-EP benötigt werden, in der Europäischen Resolution von 2004 enthalten [ResAP(2004)3E, 2004], die den Einsatz in der Lebensmittelindustrie erlauben.

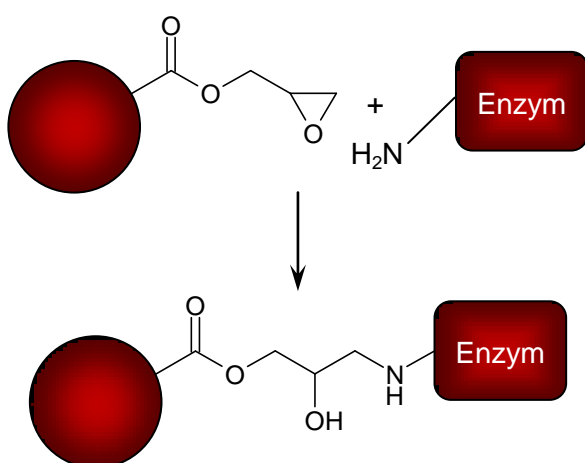


Abb. 4.5 Kovalente Bindung von Enzymen an Epoxyträger

Für die kovalente Bindung der Fructosyltransferase wurde die Ftf-Enzymlösung ($60 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1} \text{ trockener Tr\ddot{a}ger}$) mit Sepabeads® EC-EP (Resindion S.r.l., Binasco/ Italien) ($4 \text{ mL g}^{-1} \text{ feuchter Tr\ddot{a}ger}$) für 24 h bei 20°C gerührt. Nach 0 min, 10 min, 20 min, 30 min, 1 h, 2 h und 24 h wurden vom Überstand Proben entnommen und diese hinsichtlich ihrer Ftf-Enzymaktivität und der Proteinmengen analysiert. Die Bestimmung des Proteingehalts im Überstand erfolgte mittels Bradford-Test (Kapitel 4.4.4.3.) [Bradford 1976]. Die Adsorptionsrate der Fructosyltransferase wird aus der Enzymaktivität im Überstand kalkuliert.

4.6.3. Adsorption an verschiedene Träger

4.6.3.1. Adsorption an Bentonit

Bentonit ist ein Mineral, das von dem amerikanischen Geologen Knight nach dem ersten Fundort (1898) bei Fort Benton im Bundesstaat Wyoming (USA) benannt wurde. Hauptbestandteil und maßgebend für seine Eigenschaften (z.B. Quellfähigkeit, Adsorption) ist das Tonmineral Montmorillonit (60 – 80 %; benannt nach einer Lagerstätte bei Montmorillon/ Südfrankreich). Neben Montmorillonit enthalten Bentonite Begleitminerale in veränderlichen Anteilen, wie Quarz, Glimmer, Feldspat, Pyrit oder Kalk [Grim und Güven, 1978; Weiss, 1958].

Die Quelleigenschaften des Montmorillonits werden je nach Größe und Ladung der austauschbaren Kationen bestimmt.

Um ein einheitliches Trägermaterial zu erhalten, wird das käuflich erworbene Bentonit der Firma Roth konditioniert.

Durch Zugabe von Wasserstoffperoxid werden organische Verunreinigungen (z.B. Huminsäuren) des Bentonits oxidiert und durch Waschen aus dem Mineral entfernt [Weiss, 1958]. Durch die Behandlung des Bentonits mit 1 M NaCl-Lösung werden die Zwischenschichtionen (Alkali- und Erdalkaliionen) ausgetauscht und das Bentonit wird in eine reine Natriumform umgewandelt.

Diese Konditionierung des Bentonits erfolgt mit Wasserstoffperoxid und NaCl entsprechend der standardisierten Methode nach Nowikow (1995). Das erhaltene, konditionierte Bentonit wird in 0,05 M NaCl bei 4 °C gelagert.

Für die Adsorption der Fructosyltransferase an den Träger wird von dem konditionierten Bentonit eine 2,2 g L⁻¹-Lösung mit Sörensenpuffer (50 mM, pH 6,6) hergestellt. Es werden verschiedene Konzentrationsverhältnisse Enzym:Adsorber eingestellt, indem von der Enzymlösung verschiedene Verdünnungen hergestellt werden.

Es werden 2 mL der 2,2 g L⁻¹-Bentonitlösung in ein Eppi pipettiert und für 10 min bei 13.400 rpm (ThermoScientific – Heraeus Fresco21, Rotor: 75003424) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend werden je 2 mL der verschiedenen Enzymverdünnungen in die jeweiligen Eppis pipettiert, das Bentonitpellet resuspendiert und zur Einstellung des Adsorptionsgleichgewichtes über Nacht bei 4 °C am Rotator inkubiert. Das

Verhältnis von Bentonit zu Fructosyltransferase bewegt sich zwischen 20:1 und 1:2 auf Massenbasis. Als Vergleichslösungen dienen die entsprechenden Enzymverdünnungen ohne Bentonit, die ebenfalls über Nacht am Rotator inkubiert werden.

Die Auswertung der Adsorption erfolgt durch Proteinbestimmung nach Bradford des Überstandes und der Enzymreferenzlösung ohne Bentonit und durch Aktivitätstests (entsprechend Kapitel 4.4.3.3.) der Bentonitlösungen, der Überstände und der Enzymreferenzlösungen.

4.6.3.2. Adsorption an Hydroxylapatit

Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) ist ein hydroxyliertes Calciumphosphatsalz. Es bildet die Grundlage der Hartsubstanz aller Wirbeltiere und entsteht im Körper durch Biomineralisation. Es ist zu einem Anteil von 40 % in Knochen, zu 70 % in der Kalzifizierungszone von Gelenkknorpel und zu 95 % im Zahnschmelz enthalten. Anwendung findet Hydroxylapatit in der chemischen Industrie, in der es ein wichtiges Mineral zur Gewinnung von Phosphor und damit zur Herstellung von Düngemitteln und Phosphorsäure ist, sowie in der Medizin als Biomaterial zum Knochenersatz [Dorozhkin und Epple, 2002]. Des Weiteren dient es als stationäre Phase in der säulenchromatographischen Trennung von Proteinen. Die Hydroxylapatit-Chromatographie stellt eine Alternative zur klassischen Ionenaustauschchromatographie dar. Hydroxylapatit hat sowohl positiv geladene Calciumgruppen als auch negativ geladene Phosphatgruppen als funktionelle Gruppen. Basische Proteine werden mit ihrer Aminogruppe an die Phosphatgruppe von Hydroxylapatit adsorbiert, wohingegen saure Proteine eine Ionenbindung zwischen ihrer Carboxylgruppe und der Calciumgruppe des Hydroxylapatits eingehen (Abbildung 4.6) [Bernardi et al., 1972].

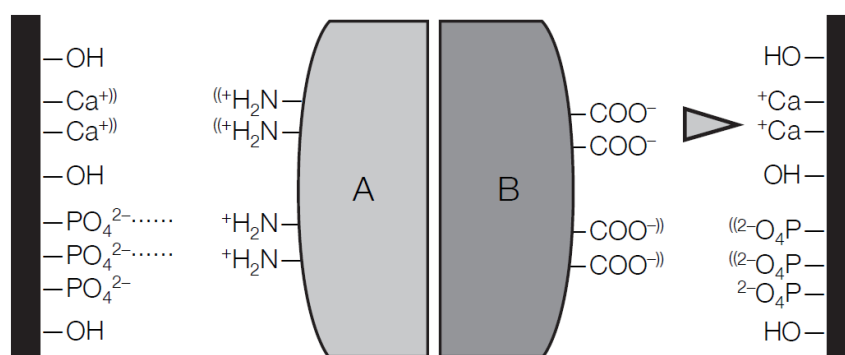


Abb. 4.6 Bindung der Proteine an Hydroxylapatit mit A: basisches Protein; B: saures Protein („Dreieck“-Bindung: kovalente Bindung; „Gepunktete“-Bindung: ionische Bindung; „Doppelklammer“-Bindung: Abstoßung) [Gagnon et al., 2009]

Die Eigenschaft des Hydroxylapatits zur Adsorption von Proteinen wurde hinsichtlich der Eignung zur Adsorption der Fructosyltransferase aus *Bacillus megaterium* untersucht.

Die Bestimmung der Adsorptionsisotherme für Hydroxylapatit (Type I, Sigma-Aldrich; 237 g L⁻¹) wird entsprechend der Adsorption an Bentonit durchgeführt (Kapitel 4.6.3.1.), allerdings wird die Hydroxylapatitlösung in einer Konzentration von 3 g L⁻¹ eingesetzt. Die Startproteinkonzentrationen variieren zwischen 0,09 und 2,5 g L⁻¹.

4.6.4. Einschluss der adsorbierten Fructosyltransferase

Für einen Betrieb im kontinuierlichen System ist es wichtig, die Rückhaltung des Enzyms zu gewährleisten. Da es sich bei dem an Bentonit adsorbierten Enzym um sehr kleine Partikel handelt, soll mittels eines zweiten Immobilisierungsschrittes die Größe der Partikel erhöht werden, indem diese in eine Alginatmatrix eingeschlossen werden.

Um zu verhindern, dass die Alginatperlen zu leicht sind und auf der Reaktionslösung aufschwimmen, wird der Alginatlösung Microsil® (Quarzmehl; SiO₂) entsprechend den Ergebnissen von Berensmeier et al. (2004) hinzugefügt. Dieses erhöht die Dichte der Perlen, hat jedoch keinen Einfluss auf die Substratreaktion der Fructosyltransferase [Berensmeier et al., 2004].

4.6.4.1. Herstellung der Alginatperlen

Zur Herstellung von immobilisierter Fructosyltransferase in Alginatperlen werden die in Tabelle 4.6 aufgeführten Lösungen und Materialien benötigt. Sie zeigt das Standardrezept für ca. 400 g Perlen.

Tab. 4.6 Standardrezeptur für die Herstellung von Ca-Alginatperlen

Lösung / Material	V [mL]	m [g]
Lösung von adsorbierter Ftf	50	/
Alginsäure Natriumsalz	/	14
25 mM NaAc-Puffer, pH 5,4	400	/
Microsil®-Sand	/	35
200 mM CaCl ₂ -Lösung, pH 5,4	min. 500	/

Alle benötigten Lösungen werden vor deren Einsatz im Kühlschrank vorgekühlt, so dass in den folgenden Schritten leichter gekühlt werden kann.

Für die Herstellung der Ca-Alginat-Perlen wird zunächst eine 3,5 %ige Na-Alginat-Lösung aus Alginsäure Natriumsalz hergestellt. Dafür werden 14 g Alginat Natriumsalz und 400 mL 25 mM NaAc-Puffer vermischt und homogenisiert. Die entstehende hochviskose Lösung wird zur Entgasung für mindestens 12 h im Chromatographiekühlschrank bei 4 °C gerührt (Kapitel 4.6.1.). Anschließend werden 35 g des Microsil®-Sandes der Lösung hinzugefügt und wieder für mindestens 12 h im Kühlschrank bei 4 °C gerührt.

Die Enzymlösung der an Bentonit adsorbierten Fructosyltransferase muss sorgfältig mit dem Na-Alginat-Microsil®-Gemisch vermischt werden, damit Perlen homogener Zusammensetzung entstehen.

Die Perlen werden durch ionotrope Gelierung hergestellt, indem das Na-Alginat-Microsil®-Enzym-Gemisch unter Druck in eine 200 mM CaCl_2 -Lösung pH 5,4 (Vernetzerlösung) getropft wird. Die Perlen und die Vernetzerlösung werden während der Herstellung kontinuierlich gerührt. Anschließend werden die Perlen noch für weitere 20 min in der Vernetzerlösung gerührt, um deren Aushärtegrad zu erhöhen. Abbildung 4.7 zeigt den Aufbau der verwendeten Immobilisierungsapparatur.

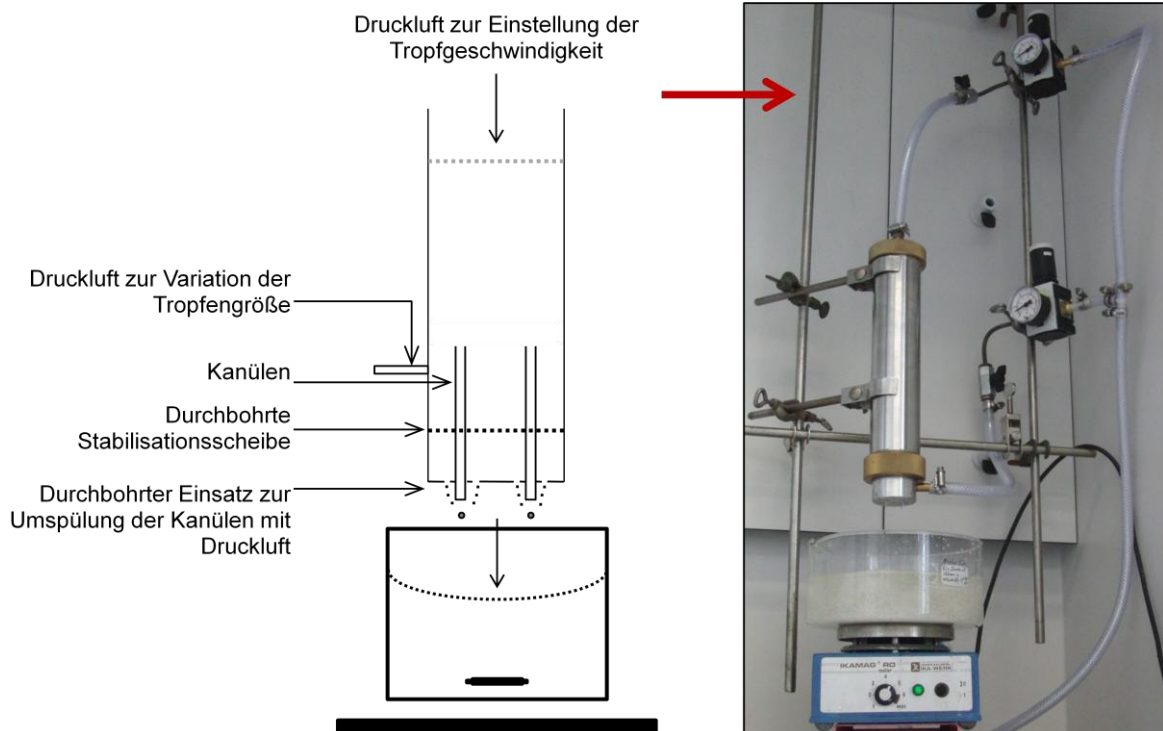


Abb. 4.7 Aufbau der Immobilisierungsapparatur

Anschließend werden die Perlen mehrmals mit CaAc-Puffer (25 mM, pH 5,4) gewaschen, mit Papierhandtüchern getrocknet, das Gewicht der hergestellten Perlen ermittelt und bis zur Verwendung in CaAc-Puffer (25 mM, pH 5,4) bei 4 °C gelagert.

4.6.4.2. Bestimmung der Aktivität der Bentonit-Alginat-Immobilisate

Um die Enzymaktivität der eingeschlossenen Fructosyltransferase zu bestimmen, wird der Aktivitätstest aus Kapitel 4.4.3.3. entsprechend Tabelle 4.7 abgewandelt.

Tab. 4.7 Reaktionsansatz zur Aktivitätsbestimmung des eingeschlossenen Enzyms

0,5 M	Saccharose
1 g	Alginatperlen
→ durchgeführt in Sörensenpuffer (50 mM, pH 6,6), bei 37 °C, im Thermoschüttelblock, 900 rpm	
→ Reaktionsvolumen: 5 mL	

Die Enzymaktivität der Alginatperlen wird nach Gleichung 4.2 ermittelt.

$$\text{Aktivität [U g}^{-1}\text{ Perlen]} = \frac{c_{\text{Glucose}} \cdot V_{\text{Reaktionsansatz}}}{t_{\text{Inkubation}} \cdot m_{\text{eingesetzte Perlen}}} \quad (4.2)$$

4.7. Kinetische Untersuchungen der Fructosyltransferase

Die Charakterisierung der *SacB* bezüglich pH- und Temperaturoptimum sowie die Ermittlung der kinetischen Parameter der Substratreaktion erfolgte in der Arbeit von Homann et al. (2007).

Alle kinetischen Untersuchungen wurden bei 37 °C, pH 6,6 und einer Enzymaktivität von 5 U mL⁻¹_{Reaktionsansatz} durchgeführt.

4.7.1. Kinetische Experimente mit nativer Fructosyltransferase

Zur Bestimmung der K_M - und v_{\max} -Werte wurden die Anfangskonzentrationen von Saccharose und Galacturonsäure variiert (Tabelle 4.8). Nach verschiedenen Zeitintervallen wurden Proben entnommen, die sofort für 15 min bei 96 °C im Thermoblock inaktiviert

wurden. Die Proben wurden per HPAEC analysiert. Dafür mussten sie entsprechend $c < 0,2 \text{ g L}^{-1}$ verdünnt werden.

Tab. 4.8 Reaktionsansätze ($V = 20 \text{ mL}$) zur Bestimmung der kinetischen Parameter der nativen Ftf

Versuchsnummer	GalA [mM]	Suc [mM]	Probenzeitpunkte [min]
A	50	100	0, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180
B	50	500	
C	100	100	
D	100	500	
E	250	100	0, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 300
F	250	500	
G	500	100	
H	500	500	
I	750	500	0, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 300, 360
J	750	1000	

4.7.2. Kinetische Experimente mit adsorbierter Fructosyltransferase

Grundlage für die Ermittlung der kinetischen Parameter der an Bentonit adsorbierten Fructosyltransferase bildet die Charakterisierung des Adsorbats, die zur Bestimmung der optimalen Enzymkonzentration für die Fixierung an dem Träger herangezogen wurde.

Für die Adsorption wurde das Verhältnis von $0,35 [\text{g}_{\text{Fructosyltransferase}} \text{ g}^{-1}_{\text{Bentonit}}]$ gewählt. Nach der Adsorption wurde die Enzymaktivität ermittelt, damit das einzusetzende Volumen der adsorbierten Fructosyltransferase für die kinetischen Messungen berechnet werden kann.

Die Durchführung der Experimente erfolgte entsprechend Tabelle 4.9. Analog Kapitel 4.7.1. erfolgte die Quantifizierung der Reaktionen mittels HPAEC.

Tab. 4.9 Reaktionsansätze ($V = 20 \text{ mL}$) zur Bestimmung der kinetischen Parameter der adsorbierten Ftf

Versuchsnummer	GalA [mM]	Suc [mM]	Probenzeitpunkte [min]
K	50	100	0, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180
L	50	500	
M	100	100	
N	100	500	
O	250	100	0, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 300
P	250	500	
Q	500	100	
R	500	500	
S	750	500	0, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 300, 360
T	750	1000	

4.7.3. Kinetische Experimente mit eingeschlossener Fructosyltransferase

Der Einschluss der Fructosyltransferase erfolgt nach der Anweisung aus Kapitel 4.6.4.1. Die zuvor durchzuführende Adsorption wird nach 4.6.3.1. durchgeführt. Nach der Herstellung der Bentonit-Alginat-Immobilisate wird das Gewicht der Perlen bestimmt und ein Aktivitätstest entsprechend 4.6.4.2. durchgeführt, um die Enzymaktivität in $\text{U g}^{-1}_{\text{Perlen}}$ zu errechnen.

Die Durchführung der kinetischen Untersuchungen erfolgte analog Kapitel 4.7.1. und 4.7.2. Tabelle 4.10

Tab. 4.10 Reaktionsansätze ($V = 20 \text{ mL}$) zur Bestimmung der kinetischen Parameter der Bentonit-Alginat Ftf

Versuchsnummer	GalA [mM]	Suc [mM]	Probenzeitpunkte [min]
IA	50	100	0, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180
IB	50	500	
IC	100	100	
ID	100	500	
IE	250	100	0, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 300
IF	250	500	
IG	500	100	
IH	500	500	
II	750	500	0, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 300, 360
IJ	750	1000	

4.7.4. Modellierungen mittels der Software ModelMaker3[®]

Das Reaktionsmodell wurde durch eine Kombination von Runge-Kutta-Integration und Simplexalgorithmus zur iterativen Parameteroptimierung mit der Software ModelMaker3[®] (Cherwell Scientific Publishing Ltd.) entwickelt und optimiert. Neben der Produktbildung müssen auch Parameter definiert werden, die die Hydrolyse und die Polymerbildung berücksichtigen.

4.8. Aufreinigung und Analyse der neuartigen Produkte

4.8.1. Untersuchungen zur reaktionsintegrierten Produktadsorption an Zeolithen

Die Vorgehensweise für das Screening nach einem geeigneten Zeolithen, der eine spezifische Adsorption des Produktes Galacturonsäure-Fructosid ermöglicht, soll im Folgenden beschrieben werden.

Die Adsorptionsversuche erfolgten im 2 mL Maßstab in einem Eppli. Dabei wurden verschiedene Massenverhältnisse von Adsorber zu Produktlösung bzw. Galacturonsäurelösung eingestellt (1:5 und 1:2, siehe Tabelle 4.11). Die zu untersuchenden Adsorber wurden mit der Produktlösung bzw. der Galacturonsäurelösung unterschiedlicher Konzentration in Kontakt gebracht und bei 4 °C am Rotator für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsansätze bei 13.400 rpm für 10 min zentrifugiert (ThermoScientific – Heraeus Fresco21, Rotor: 75003424 bzw. Eppendorf, Minispin). Die Analyse der Adsorptionsversuche wurde mit den Überständen mittels HPAEC (Dionex; Kapitel 4.8.2.2.) durchgeführt.

Tabelle 4.11 stellt eine Zusammenfassung der Adsorber bzw. Zeolithe dar, die hinsichtlich des Potentials zur reaktionsintegrierten Produktaufreinigung von Galacturonsäure-Fructosid untersucht wurden.

Tab. 4.11 Untersuchte Adsorber bzw. Zeolithe zur reaktionsintegrierten Produktaufreinigung

Adsorber / Zeolith	Verhältnis von Adsorber:Produktlösung
Calcigel	1:5
Opazil AO	1:5
Tixoton	1:5
BEA25	1:5 und 1:2
BEA25, behandelt, Kationenaustausch	1:5 und 1:2
BEA150	1:5 und 1:2
BEA150, konditioniert mit NaCl	1:5 und 1:2
Hydrophobiertes Naturzeolith (Hydrophobierungsmittel: Siloxan; Firma: Ostwesttransfer)	1:5 und 1:2

4.8.2. Chromatographische Techniken

4.8.2.1. Dünnschichtchromatographie (DC)

Stationäre und mobile Phase

Zur qualitativen Analytik der Zuckergemische mittels Dünnschichtchromatographie werden Proben von 3 µL auf mit Kieselgel 60 F₂₅₄ beschichtete Alufolien mit Konzentrierungszone der Firma Merck/ Darmstadt getüpfelt, getrocknet und anschließend in folgenden Laufmitteln entwickelt:

Zuckergemische, die keine Galacturonsäure enthalten:

Wasser:Isopropanol:Ethylacetat (WIE) 1:3:5 (v:v:v)

➔ Für eine bessere Auftrennung wird die DC-Folie in die äquilibrierte Laufkammer überführt und bis zu einer Laufmittelfront von 10 cm über der Konzentrierungszone laufen gelassen, anschließend getrocknet, und dieses Verfahren dreimal wiederholt.

bzw.

Acetonitril:Wasser 80:20 % (v:v)

Zuckergemische, die Galacturonsäure enthalten:

1-Propanol:Ethylacetat:Acetonitril:Wasser (1-P:EAW) 25:10:40:25 % (v:v:v:v)

Für die Untersuchungen der Fraktionen der Säulenchromatographien werden DC-Fertigfolien Polygram® SIL G/UV₂₅₄, Schichtdicke 0,2 mm der Firma Macherey-Nagel GmbH & Co. KG/ Düren verwendet. Mit diesen werden die einzelnen Fraktionen der Trennungen lediglich hinsichtlich vorhandener oder nicht vorhandener Zucker untersucht, indem entsprechend Abbildung 4.8 3 µL der jeweiligen Fraktionen auf die DC-Folie pipettiert, getrocknet und anschließend direkt angefärbt werden. Die Fraktionen, die Zucker enthalten (Färbung des Spots), werden auf Kieselgel-Folien bzw. mittels HPAEC weiteruntersucht.

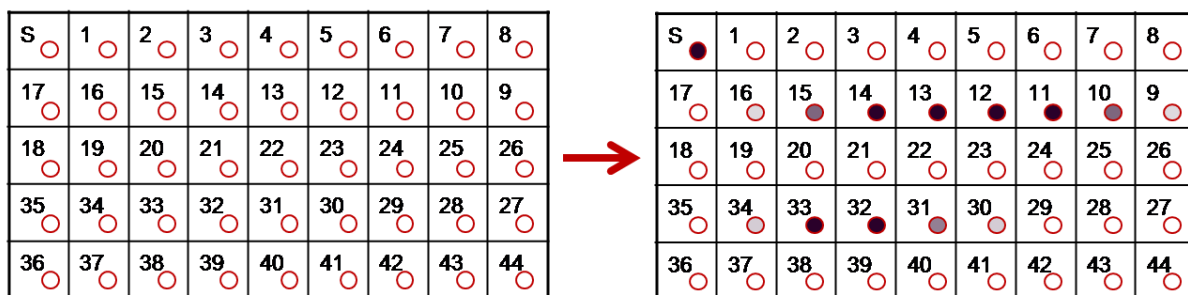


Abb. 4.8 DC-Folie zur Analyse der Fraktionen der Säulenchromatographie hinsichtlich des Vorhandenseins von Zuckern

Detektion der Zuckermoleküle

Die optische Detektion der Zuckerspots erfolgte durch Eintauchen der Kieselgelfolien für 3 s in eine Färbereagenz und anschließender Erwärmung auf 100 °C für 30 min. Durch parallel aufgetragene Standardlösungen können die detektierten Zucker zugeordnet werden.

Färbereagenz:

2-(1-Naphthylamino)ethylamine dihydrochloride	3	g L ⁻¹
konz. Schwefelsäure	5	% (v:v)
Methanol	95	% (v:v)

➔ Lagerung: lichtgeschützt

4.8.2.2. Analytische HPLC bzw. HPAEC

Mobile bzw. stationäre Phasen

Für die quantitative Auswertung der enzymatischen Reaktionen bzw. der Quantifizierung der Aufreinigungsversuche werden folgende HPLC- bzw. HPAEC-Systeme eingesetzt:

- Zur Trennung des Substanzgemisches wird eine Anionenaustauschsäule mit Vorsäule (CarboPac PA1 der Firma Dionex, analytische Säule: 4x250 mm; Vorsäule: 4x50 mm) und 0,1 M NaOH als Basislaufmittel eingesetzt. Die Proben werden bei 20 °C und einem Durchfluss von 1,0 mL min⁻¹ mit Helium-entgastem Laufmittel eluiert. Die Detektion erfolgt mit einem amperometrisch gepulsten Detektor mit einer Goldelektrode (PAD-System). Das Probenvolumen von 10 µL wird über einen linearen Gradienten von 100 % Basislaufmittel zu 50 % Basislaufmittel/ 50 % 1 M NaAc in 0,1 M NaOH (37 min) eluiert. Anschließend wird die Säule mit dem Basislaufmittel equilibriert (weitere 23 min). Tabelle 4.12 zeigt den verwendeten Laufmittelgradienten. Zur Quantifizierung werden Standardlösungen (Glucose, Fructose, Saccharose, Galacturonsäure) in den Konzentrationen $c < 0,2 \text{ g L}^{-1}$ verwendet.

Tab. 4.12 Verwendeter Laufmittelgradient der HPAEC

Zeit [min]	Eluent A (= Basiseluent) 100 mM NaOH [%]	Eluent B 1 M NaAc in 100 mM NaOH [%]
0	100	0
5	100	0
25	75	25
30	50	50
35	50	50
37	100	0
60	100	0

- Neben der HPAEC wird für Zuckerlösungen, die keine Galacturonsäure enthalten, eine HPLC-Säule von YMC verwendet (Polyamine II; 150x4,6), bei der die Elution der Zucker isokratisch mit 75 % Acetonitril erfolgt und eine Säule von Phenomenex (Rezex RCM Monosaccharide Ca⁺; 300x7,8), die mit Milli-Q Wasser als Eluenten betrieben wird. Die Flussrate beträgt 1,0 mL min⁻¹. Der Kalibrierbereich der Zuckerstandards ist 2 bis 20 g L⁻¹.

Detektion

Bei der HPAEC erfolgt die Erfassung der Zuckermoleküle durch gepulste amperometrische Detektion (PAD). Bei der PAD werden bei hohen pH-Wert die Alkoholfunktionen der Zucker partiell als Alkoholate ionisiert. Dabei verhalten sich die Zucker anionisch und werden durch die Anionenaustauschersäule zurückgehalten. Je mehr Alkoholfunktionen ein Molekül trägt, desto stärker ist die Rückhaltung dieses Moleküls auf der Säule. Die Zuckermoleküle

eluieren daher mit steigendem Polymerisationsgrad langsamer. Darüber hinaus ist die Ionisierbarkeit der OH-Gruppe von der Gesamtgestalt des Moleküls abhängig. Je ionisierbarer die OH-Gruppen eines Zuckers sind, desto stärker wird der Zucker über die Säule zurückgehalten. Dadurch ist eine Trennung von verschiedenen Zuckern mit gleichem Polymerisationsgrad möglich. Zuckersäuren, wie die Galacturonsäure, sind in diesem System noch stärker ionisiert als die Zucker und werden entsprechend stärker zurückgehalten. Die Detektion der Zucker und Zuckersäuren erfolgt durch pulsierende Amperometrie mit einer Goldelektrode (PAD). Dabei werden sie bei hohem pH-Wert elektrochemisch oxidiert, und das entsprechende zeitliche Auftreten der Oxidationsströme wird bestimmt.

Die Pulsung des angelegten Potentials führt zu einer höheren Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit [Surmann, 1983].

Abbildung 4.9 zeigt ein Chromatogramm der Auftrennung des Produktgemischs mit Galacturonsäure-Fructosid mittels HPAEC. Außerdem sind in Abbildung 4.9 die Retentionszeiten der Zucker angegeben.

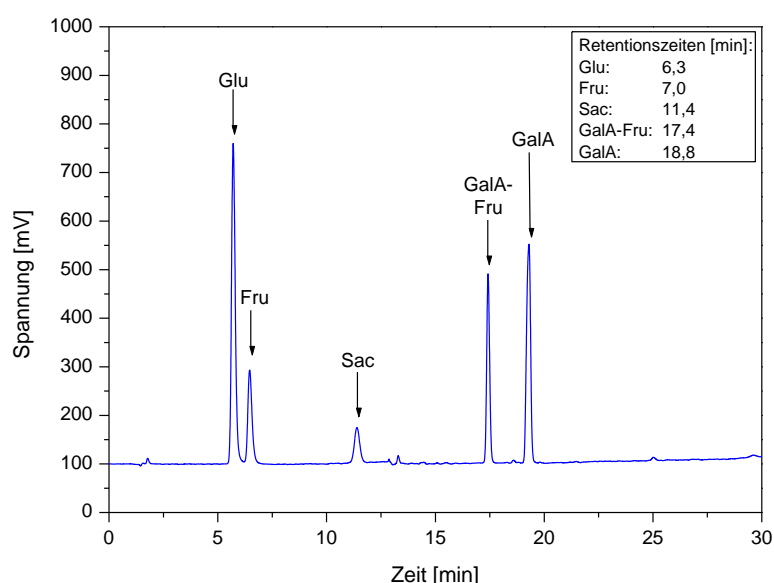


Abb. 4.9 Chromatogramm der Produktlösung mit GalA-Fru (Messung mit HPAEC)

Für die HPLC (Säule: YMC Pack Polyamine II bzw. Phenomenex Rezex RCM Monosaccharide Ca⁺) wird ein Brechungsindex-Detektor (RI, von englisch: refractive index) verwendet. Dieser registriert alle Substanzen, die eine Änderung des Brechungsindex der Lösung gegenüber der reinen mobilen Phase aufweisen.

4.8.2.3. Präparative Chromatographie

Die Säulenchromatographie stellt in der Biotechnologie eine weit verbreitete Methode zur Produktaufreinigung dar. Die Trennstrecke ist eine mit einer stationären Phase gefüllte Säule, durch die das Probengemisch von der mobilen Phase gespült und dabei in einzelne Bestandteile getrennt wird. Die Probennahme erfolgt durch Fraktionieren nach verschiedenen Zeitintervallen. Die einzelnen Substanzen werden nach dem Verlassen der Säule mittels HPLC bzw. HPAEC detektiert (Kapitel 4.8.2.2.).

Zur Aufreinigung der neuen FOS wurden verschiedene Austauschmaterialien untersucht.

Biogel

Zur Aufreinigung wurde das Biogel Bio-Gel[®] P2 der Firma Bio-Rad verwendet. Dabei handelt es sich um ein Polyacrylamidgel, bei dem die Moleküle entsprechend ihrer Molekülgröße aufgetrennt werden. Tabelle 4.13 stellt die verwendeten Parameter zusammen.

Tab. 4.13 Parameter der Säulenchromatographie mit Bio-Gel[®] P2

Höhe der Säule [cm]	46	100
Höhe des Austauschmaterials [cm]	30	87
Durchmesser der Säule [cm]	4	3
Arbeitsdurchfluss [mL min⁻¹]	0,8 – 1,0	2,0 – 2,0
Arbeitstemperatur [°C]	20	20
Probenkonzentration [g_{Gesamtzucker}]	1	1
Mobile Phase	deion. Wasser	0,1 M NaAc

Bei der säulenchromatographischen Trennung wurde nach jeweils einer Minute eine Fraktion genommen. Die einzelnen Fraktionen wurden zunächst, wie in Kapitel 4.8.2.1. beschrieben, hinsichtlich ihres Zuckergehalts untersucht. Anschließend wurden die Fraktionen, in denen Zucker mittel DC detektiert werden konnten, über HPAEC analysiert.

Anionenaustauscher

Es wurden sowohl schwach basische (Dowex Monosphere 66) als auch stark basische (Dowex MSA-2, CI-Form) Ionenaustauscher untersucht. Tabelle 4.14 zeigt die verwendeten Prozessparameter.

Tab. 4.14 Parameter der Säulenchromatographien mit Anionenaustauschern

Höhe der Säule [cm]	25	80
Höhe des Austauschmaterials [cm]	15	60
Durchmesser der Säule [cm]	1,5	4
Arbeitsdurchfluss [mL min⁻¹]	0,6	10,0
Arbeitstemperatur [°C]	20	60
Probenkonzentration [g_{Gesamtzucker}]	0,5	3
Stationäre Phase	Dowex MSA-2	Dowex Monosphere 66
Mobile Phase	100 mM NaOH bzw. 5 %ige NaOH	Verschiedene: deion. Wasser 0,1 M HCl 0,1 M NaOH 1 M NaOH

Die Analyse der Fraktionen erfolgte analog der Trennung mit Biogel.

Kationenaustauscher

In Baciú (2005) wurde Galacturonsäure über den Kationenaustauscher Finex CS 13 GC Na⁺-Form aufgereinigt. Da dieser Ionenaustauscher nicht mehr hergestellt wird, wurde das äquivalente Austauschmaterial Amberlite CG-120 Na⁺-Form auf dessen Eignung zur Aufreinigung des Galacturonsäure-Fructosids untersucht.

Des Weiteren wurde der Kationenaustauscher Purolite PCR 642 Ca⁺ als Größenausschlussmaterial eingesetzt. Die beiden Kationenaustauscher unterscheiden sich lediglich hinsichtlich ihrer Ionenform (Amberlite: Na⁺-Form; Purolite: Ca⁺-Form), ihre Matrix (Styrol vernetzt mit DVB) und funktionelle Gruppe (Sulfonsäure) sind gleich. Tabelle 4.15 fasst die verwendeten Parameter zusammen.

Tab. 4.15 Parameter der Säulenchromatographien mit Kationenaustauschern

Höhe der Säule [cm]	100	2000
Höhe des Austauschmaterials [cm]	30	1500
Durchmesser der Säule [cm]	3	15
Arbeitsdurchfluss [mL min⁻¹]	5,0	60
Arbeitstemperatur [°C]	20	70
Probenkonzentration [g_{Gesamtzucker}]	1	36
Stationäre Phase	Purolite PCR 642 Ca ⁺ ; Amberlite CG-120 Na ⁺ -Form	Purolite PCR 642 Ca ⁺
Mobile Phase	Verschiedene: deion. Wasser 0,04 mM NaOH, pH 7,9 0,1 mM NaOH, pH 9,5 1,0 M NaAc Pufferlösung, pH 4,0	deion. Wasser

Mischbett

Die Fraktionen der Säulenchromatographien, die Natronlauge als Eluenten verwendeten, wurden mit konzentrierter Salzsäure neutralisiert. Um das dabei entstandene Salz zu entfernen, wurde der Mischbett-Ionenaustauscher Dowex Monosphere 450 eingesetzt.

4.8.3. Untersuchungen zur mikrobiellen Aufreinigung mittels *Zymomonas mobilis*

Anlehnend an die Studie von Crittenden und Playne (2002) wurden mikrobielle Untersuchungen mit *Zymomonas mobilis* ATCC 39676 zur Aufreinigung des Galacturonsäure-Fructosids aus dem Produktgemisch durchgeführt.

Die Versuche wurden in Batch-Ansätzen mit freien *Zymomonas mobilis*-Zellen durchgeführt. Dafür wurden diese zunächst in einem Wachstumsmedium entsprechend Crittenden und Playne (2002) herangezüchtet (siehe Kapitel 4.3. bzw. 4.4.5.).

Nach der Zellernte (BTM: 9 g L⁻¹) wurden die Bakterienzellen mit einer FOS-Produktlösung (350 g L⁻¹ Gesamtzucker) vermischt und bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Es wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen, die für 15 min bei 96 °C im Thermoblock inaktiviert wurden.

Die Quantifizierung der Umsetzungen erfolgte mittels HPAEC.

4.8.4. Analyse der neuartigen FOS

Die Strukturaufklärung der neuen FOS erfolgte durch Kernspinresonanzspektroskopie und Massenspektrometrie. Die Analysen wurden am Institut für Organische Chemie der TU Braunschweig durchgeführt.

Für die NMR-Analyse der FOS wurden die Proben gefriergetrocknet und in D₂O gelöst. ¹H-, ¹³C- und ¹³C-DEPT-Spektren wurden mit einem AVII300 der Firma Bruker (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) aufgenommen.

Die Massenspektren wurden mit dem Modell MAT 8400-MSS I bzw. MAT 4515 der Firma Finnigan (Thermo Finnigan MAT GmbH, Bremen) mit der Elektronenspray-Ionisierungsmethode (ESI) aufgenommen.

4.9. Kontinuierlicher Prozess zur Produktion von neuartigen FOS

Abbildung 4.10 zeigt schematisch den Aufbau des kontinuierlich betriebenen Systems zur Produktion der Fructooligosaccharide. Die Pumpenkennlinien zur Ermittlung der Volumenströme zur jeweiligen Drehzahl befinden sich im Anhang (Kapitel 10.4.1.).

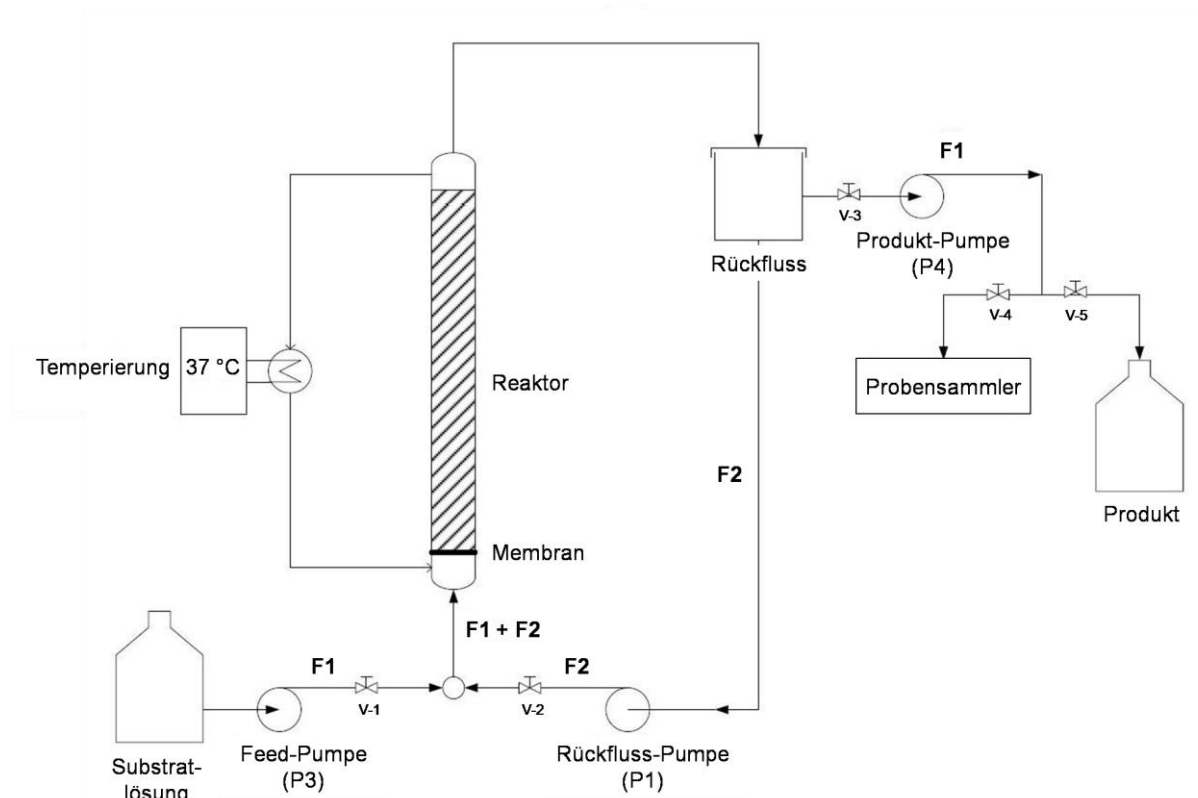


Abb. 4.10 Schematischer Aufbau des kontinuierlichen Systems zur FOS-Produktion

Die Bentonit-Alginat-Immobilisate wurden über einen Trichter in die Glassäule gefüllt, in der CaAc-Puffer (25 mM, pH 5,4) vorgelegt war.

Die Analyse der Proben erfolgte mittels HPAEC. Die daraus gewonnenen Messwerte der Konzentrationsverläufe bilden die Grundlage des kinetischen Modells zur Simulation von kontinuierlichen Versuchen.

5. Ergebnisse und Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines technischen Verfahrens zur Gewinnung neuer FOS ausgehend von dem erneuerbaren Substrat Saccharose. Zielhinführend wurden dafür folgende Aspekte bearbeitet: Suche nach dem geeigneten Biokatalysator, Immobilisierung und Charakterisierung des Enzyms sowie die Abtrennung des Produktes aus der Reaktionslösung.

5.1. Untersuchungen zur Produktbildung der Fructosyltransferase mit verschiedenen Akzeptoren

Die Grundlage zur Herstellung der Oligosaccharide aus Saccharose bildet die hohe Energie der glycosidischen Bindung der Saccharose. Die bei der Hydrolyse der Saccharose auftretende Änderung der freien Standardenthalpie ist auf $27,3 \text{ kJ mol}^{-1}$ abgeschätzt worden. Dieser hohe Wert erlaubt die Synthese der Saccharose-Analoga durch die Bereitstellung der für die Transfructosylierung benötigten Energie [Chambert und Gonzy-Tréboul, 1976].

5.1.1. Fructosyltransferasen-Screening

Ausgangspunkt dieser Arbeit war das Screening verschiedener Fructosyltransferasen auf deren Potential zur Synthese von FOS durch Fructosyltransfer von Saccharose auf die Akzeptoren Xylose, Isomaltulose und Galacturonsäure.

Für die Suche einer geeigneten Fructosyltransferase steht eine Ftf-Bibliothek zur Verfügung (SFB 578: AK Prof. Jahn (Institut für Mikrobiologie, TU Braunschweig), AK Prof. Dersch (Institut für Mikrobiologie, TU Braunschweig & HZI, Braunschweig) und AK Prof. Heinz (HZI, Braunschweig)).

Es wurden vier Fructosyltransferasen untersucht (Tabelle 5.1). Bei der A5-Mutante der *SacB* aus *Bacillus subtilis* wurde an Position 242 die Aminosäure Asparagin gegen Histidin ausgetauscht, wodurch die Mutante nicht in der Lage ist, Polymer sondern lediglich kurze Oligosaccharide und Hydrolyseprodukte zu bilden [Beine et al., 2008].

Tab. 5.1 Enzympräparationen für das Ftf-Screening

Enzym (EC-Nummer)	Quelle	
Levansucrase <i>SacB</i> (EC 2.4.1.162)	<i>Bacillus subtilis</i> NCIMB 11871	SFB 578 (AK Prof. Jahn, AK Prof. Dersch, AK Prof. Heinz, Braunschweig) [Baciu, 2005; Baciu et al., 2005]
Levansucrase <i>SacB_{A5}</i> (EC 2.4.1.162)	<i>Bacillus subtilis</i> NCIMB 11871, A5-Mutante: N242H	SFB 578 (AK Prof. Jahn, AK Prof. Dersch, AK Prof. Heinz, Braunschweig) [Beine et al., 2008; Chambert und Petit-Glatron, 1991]
Levansucrase <i>SacB</i> (EC 2.4.1.10)	<i>Bacillus megaterium</i> DSM 319	Institut für Mikrobiologie: AK Prof. Jahn [Biedendieck, 2007]
Invertase <i>Suc1</i> (EC 3.2.1.26)	<i>Aspergillus niger</i> AB1.13	SFB 578 (AK Prof. Jahn, AK Prof. Dersch, AK Prof. Heinz, Braunschweig) [Zuccaro et al., 2008]

Die Fructosyltransferase *Suc1* aus *Aspergillus niger* führte zu keiner Übertragung der Fructosyleinheit auf einen der drei Akzeptoren. Hingegen zeigten die Enzyme aus *Bacillus subtilis* und *Bacillus megaterium* die gewünschte Eigenschaft der Transfructosylierung der Akzeptoren Xylose, Isomaltulose und Galacturonsäure. Die Reaktionen mit den Akzeptoren führten zu den jeweiligen Akzeptorprodukten Xylosyl-Fructosid (Xyl-Fru), Isomaltulose-Fructosid (Iso-Fru) und Galacturonsäure-Fructosid (GalA-Fru). Polymere wurden nicht detektiert.

Es konnte gezeigt werden, dass alle drei Fructosyltransferasen der *Bacilli*-Stämme die Akzeptoren Xylose, Isomaltulose und Galacturonsäure akzeptieren und die entsprechenden FOS bilden. Jedoch konnten signifikante Unterschiede hinsichtlich ihrer Aktivitäten beobachtet werden (Tabelle 5.2).

Tab. 5.2 Ftf-Screening: Vergleich der Enzymaktivitäten (Substrat: 0,5 M Saccharose; 37 °C, pH 6,6)

Enzym (EC-Nummer)	Aktivität [U mL ⁻¹]
Levansucrase <i>SacB</i> (EC 2.4.1.162)	20
Levansucrase <i>SacB_{A5}</i> (EC 2.4.1.162)	26
Levansucrase <i>SacB</i> (EC 2.4.1.10)	1105

Bei Cheetham et al. (1989) besitzt die in *Bacillus subtilis* NCIMB 11871 extrazellulär produzierte Fructosyltransferase eine Aktivität von 8 U mL^{-1} . Die Aktivität der rekombinant hergestellten Fructosyltransferase *SacB* aus *Bacillus subtilis* in *Escherichia coli* ist mit 20 U mL^{-1} um den Faktor 2,6 höher (Tabelle 5.2).

Der Vergleich der rekombinant hergestellten Fructosyltransferasen zeigt, dass die Aktivität der *SacB* aus *Bacillus megaterium* 42 mal bzw. 55 mal so groß ist, verglichen mit den Aktivitäten der *SacB*-Varianten aus *Bacillus subtilis*.

Somit wird klar, dass die *SacB* aus *Bacillus megaterium* am besten geeignet ist, die Produkte herzustellen und wird folglich für alle weiteren Untersuchungen verwendet.

5.1.2. Untersuchungen zur Produktbildung mit der Fructosyltransferase *SacB* aus *Bacillus megaterium*

Eine Charakterisierung des Enzyms hinsichtlich Temperatur- und pH-Optimum sowie der kinetischen Parameter wurde in der Arbeit von Homann (2009) durchgeführt und beschrieben. Darauf basierend erfolgten die Versuche zur Produktbildung mit verschiedenen Akzeptoren.

5.1.2.1. Produktbildung mit Isomaltulose als Akzeptor

Isomaltulose (Markenname PalatinoseTM) ist wie Saccharose ein Disaccharid, dessen natürliche Süßkraft der von Saccharose sehr nahe kommt. Jedoch kann diese Zuckerart z.B. nicht von Karies erzeugenden Bakterien der Mundflora zur Säurebildung verwendet werden [DEI, 2006 & 2007]. PalatinoseTM findet bereits jetzt breite Anwendung, z.B. als funktionelles Kohlenhydrat in Sport- und Wellnessgetränken, Sportlernahrung, Instant- und Teegetränken, Cerealien- und Energieriegeln, Milchprodukten, Backwaren, Bier oder auch in Trinkmahlzeiten sowie in der klinischen Ernährung [BENEO-Palatinit]. Palatinose-Oligosaccharide werden z.B. in Kaugummis eingesetzt [Yatka und Richey, 1995].

In dieser Arbeit wurde Isomaltulose als Akzeptor verwendet, um das FOS Isomaltulose-Fructosid enzymatisch herzustellen. Die Fructosyltransferase *SacB* katalysiert die Umsetzung von Saccharose (Substrat) und Isomaltulose (Akzeptor) zum Isomaltulose-Fructosid (Abbildung 5.1).

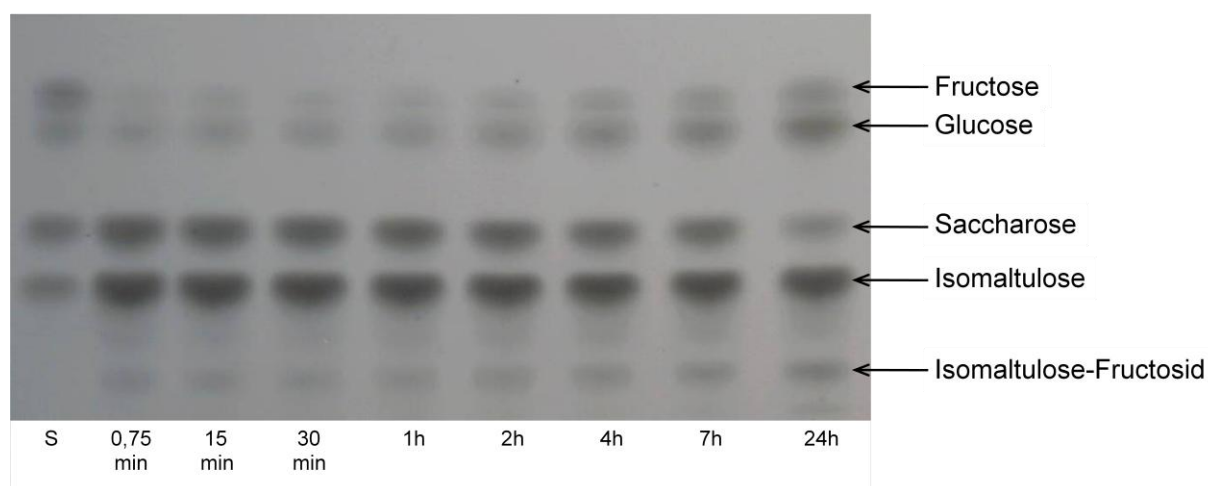


Abb. 5.1 DC der Akzeptorreaktion mit Isomaltulose (Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄; mobile Phase: WIE im Verhältnis 1:3:6; S = Standard; Reaktionsbedingungen: $c_{\text{Sac}} = 0,3 \text{ M}$, $c_{\text{Iso}} = 0,6 \text{ M}$; 37 °C; pH 6,6; 5 U mL⁻¹)

Nach 24 Stunden Reaktionszeit ergab sich ein Umsatz zum Isomaltulose-Fructosid von 25 %. Verglichen mit anderen Disacchariden als Akzeptoren, wie z.B. Isomaltose (53 %), Maltose (45 %) oder Melibiose (45 %) [Seibel et al., 2006b], ist die Transfructosylierung von Isomaltulose sehr gering.

5.1.2.2. Produktbildung mit Xylose als Akzeptor

Xylose ist ein Monosaccharid, aus dem der Zuckeraustauschstoff Xylit hergestellt wird. Dieser hat in etwa dieselbe Süßkraft wie Saccharose, jedoch einen um etwa 40 % niedrigeren Brennwert. Des Weiteren wirkt er nachweislich kariostatisch und antikariogen [Hayes, 2001; Hohmann, 2007].

Xylose ist ein wesentlich besserer Akzeptor als Isomaltulose (Abbildung 5.2). Bereits nach 15 min wurden 53 % des Akzeptorproduktes Xylosyl-Fructosid gebildet. Nach 4 h Reaktionszeit wurde eine maximale Umsetzung von 80 % erreicht.

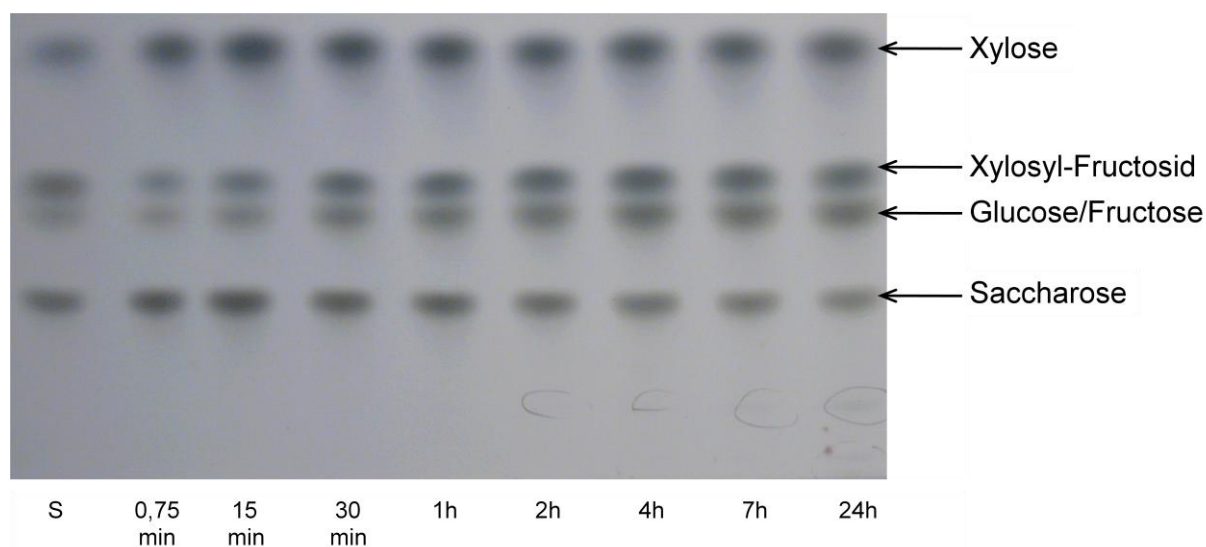


Abb. 5.2 DC der Akzeptorreaktion mit Xylose (Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄; mobile Phase: WIE im Verhältnis 1:3:6; S = Standard; Reaktionsbedingungen: $c_{\text{Sac}} = 0,3 \text{ M}$, $c_{\text{Xyl}} = 0,6 \text{ M}$; 37°C ; pH 6,6; 5 U mL^{-1})

Die enzymatische Synthese von Xylosyl-Fructosid sowie dessen Anwendungspotential wurden bereits mehrfach beschrieben [Baciu et al., 2005; Beine et al., 2008 & 2009; Boehm et al., 2005; Cheetham et al., 1989; Hestrin und Avigad, 1958; Homann, 2009; Hoshi et al., 1994; Hsu et al., 2004; Seibel et al., 2005 & 2006b].

Seibel et al. (2006b) berichten von einer optimalen Ausbeute an Xylosyl-Fructosid von 56 % (bei $c_{\text{Sac}} = 0,6 \text{ M}$, $c_{\text{Xyl}} = 1,2 \text{ M}$ und $12,2 \text{ U mL}^{-1}$).

5.1.2.3. Produktbildung mit Galacturonsäure als Akzeptor

Galacturonsäure ist eine sogenannte Zuckersäure. Sie gehört zu den Uronsäuren und kommt als Hauptbestandteil in Pektinen vor und gehört zu den Ballaststoffen.

Neben den typischen Akzeptoren zur Synthese von FOS, wie z.B. Xylose, Galactose und Isomaltose, stellen die Zuckersäuren wenig untersuchte Akzeptoren zur Bildung von Fructosylverbindungen dar.

Aufgrund ihres bereits beschriebenen enormen Anwendungspotentials und der noch wenig untersuchten Transfructosylierungen [Ringpfeif et al., 2007] wurde der Akzeptor Galacturonsäure verwendet.

Abbildung 5.3 stellt die Reaktionsgleichung der Akzeptorreaktion mit Galacturonsäure und Saccharose dar.

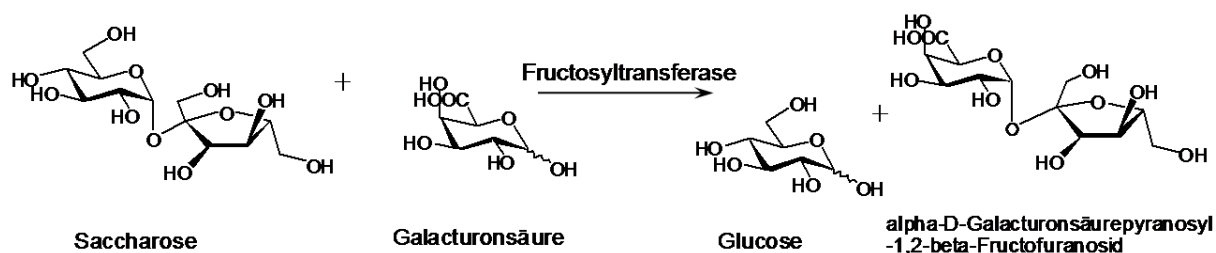


Abb. 5.3 Akzeptorreaktion der Ftf mit Saccharose und Galacturonsäure

Zur qualitativen Analyse der Akzeptorreaktion mit Galacturonsäure mittels Dünnschichtchromatographie musste eine Laufmitteloptimierung erfolgen, da eine Trennung von Galacturonsäure und Galacturonsäure-Fructosid mit den sonst üblichen Laufmitteln (80 % Acetonitril bzw. Wasser : Isopropanol : Ethylacetat im Verhältnis 1:3:6) nicht möglich ist. Zur Verbesserung der Trennung von Galacturonsäure und Galacturonsäure-Fructosid wurde die Polarität des Laufmittels erhöht, um die Wanderung der Oligosaccharide zu steigern.

Abbildung 5.4 zeigt die Trennung der Zucker in der Probe mit dem optimiertem Laufmittelgemisch 1-Propanol (1-P) : Ethylacetat (E) : Acetonitril (A) : Wasser (W) im Verhältnis 25:10:40:25 (v:v:v:v). Mit diesem wird eine Trennung von Galacturonsäure und Galacturonsäure-Fructosid erzielt. Zwar ist keine Auftrennung zwischen Fructose, Glucose und Saccharose möglich, allerdings spielt dieses hier nur eine untergeordnete Rolle, da die Dünnschichtchromatographie zur qualitativen Analyse der Akzeptorreaktion eingesetzt wurde, und somit vor allem die Bildung des Produktes widerspiegeln sollte. Zur Betrachtung der Saccharoseabnahme kann das Standardlaufmittel Wasser : Isopropanol : Ethylacetat (1:3:6, v:v:v) verwendet werden.

Die quantitative Analyse erfolgt durch Ionenaustauschchromatographie mit einer CarboPac PA1-Säule von Dionex. Die Detektion der Zucker und Zuckersäuren erfolgt durch pulsierende Amperometrie mit einer Goldelektrode (PAD). Abbildung 5.5 zeigt das Chromatogramm der HPAEC-PAD der Akzeptorreaktion mit Galacturonsäure. Das gebildete Galacturonsäure-Fructosid hat eine Retentionszeit von 17,4 min.

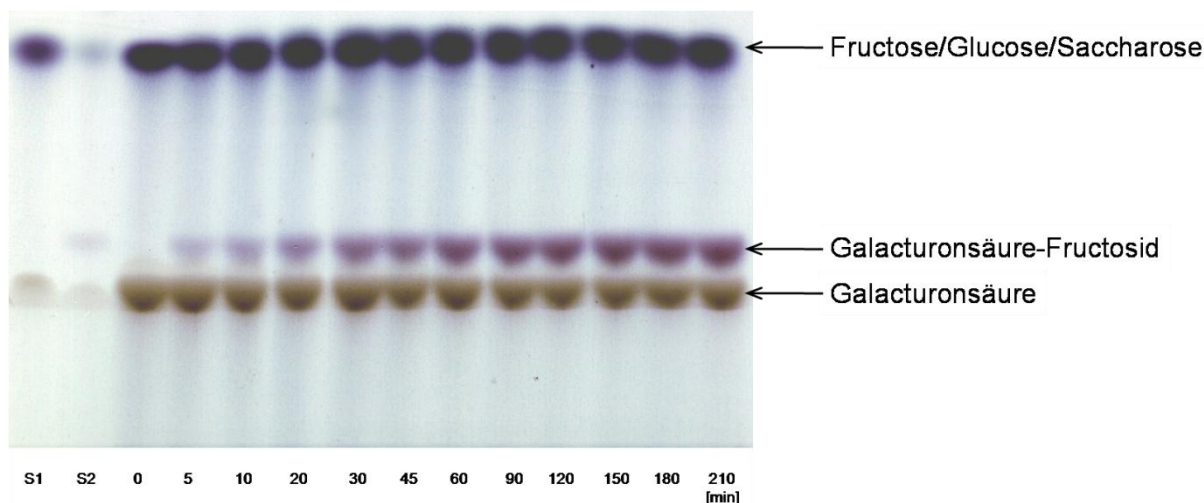


Abb. 5.4 DC der Akzeptorreaktion mit Galacturonsäure (Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄; mobile Phase: 1-PEAW im Verhältnis 25:10:40:25; S1 und S2 = Standards; Reaktionsbedingungen: $c_{\text{Sac}} = 0,3 \text{ M}$, $c_{\text{GalA}} = 0,6 \text{ M}$; 37 °C; pH 6,6; 5 U mL⁻¹)

Galacturonsäure ist, wie auch Xylose, ein sehr guter Akzeptor. Sie wird durch die Fructosyltransferase *SacB* effektiv zu dem Produkt Galacturonsäure-Fructosid umgesetzt. Bereits nach 15 min wurden 40 % Galacturonsäure-Fructosid produziert. Unter den Reaktionsbedingungen ($c_{\text{Sac}} = 0,3 \text{ M}$, $c_{\text{GalA}} = 0,6 \text{ M}$, 37 °C, pH 6,6, 5 U mL⁻¹) werden rund 86 % der Saccharose in das Oligofructosid umgewandelt.

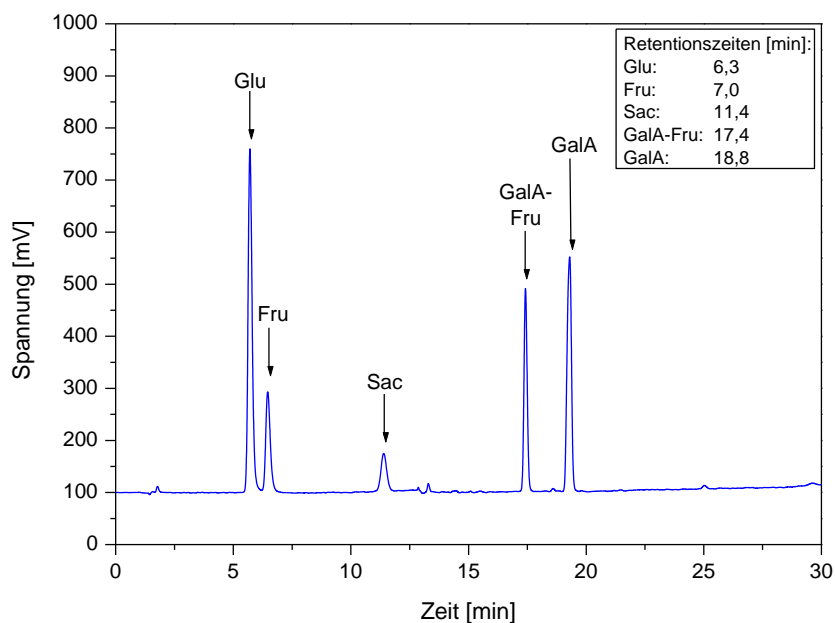


Abb. 5.5 Auftrennung der Produktlösung der Akzeptorreaktion mittels HPAEC-PAD (Reaktionsbedingungen: $c_{\text{Sac}} = 0,3 \text{ M}$, $c_{\text{GalA}} = 0,6 \text{ M}$; 37 °C; pH 6,6; 5 U mL⁻¹)

5.1.3. Kapitelzusammenfassung

Aus einer Ftf-Bibliothek (SFB 578: AK Prof. Jahn (Institut für Mikrobiologie, TU Braunschweig), AK Prof. Dersch (Institut für Mikrobiologie, TU Braunschweig & HZI, Braunschweig) und AK Prof. Heinz (HZI, Braunschweig)) konnte die Fructosyltransferase *SacB* aus *Bacillus megaterium* als geeigneter Katalysator für die Transfructosylierung der Akzeptoren Isomaltulose, Xylose und Galacturonsäure ermittelt werden.

Dabei zeigen sich Unterschiede in der Akzeptorspezifität. Isomaltulose wird im Vergleich zu den beiden anderen Akzeptoren (Xylose, Galacturonsäure) weniger effektiv zu seinem FOS umgesetzt (Isomaltulose-Fructosid: 25 %). Die Umsätze der beiden anderen Akzeptoren zu ihren FOS betrugen: Xylosyl-Fructosid 80 % und Galacturonsäure-Fructosid 86 %.

Da bereits eine Reihe von Untersuchungen zur Bildung des Xylosyl-Fructosid durchgeführt wurden [Baciu et al., 2005; Beine et al., 2008 & 2009; Boehm et al., 2005; Hestrin und Avigad, 1958; Homann, 2009; Hoshi et al., 1994; Hsu et al., 2004; Seibel et al., 2005 & 2006b] und die Synthese des Isomaltulose-Fructosid relativ geringe Umsätze verzeichnet, wurden alle weiteren Untersuchungen hinsichtlich der Entwicklung eines Prozesses zur produktintegrierten Synthese neuer FOS mit dem Akzeptor Galacturonsäure durchgeführt.

5.2. Immobilisierung der Fructosyltransferase

Es ist bekannt, dass für technische Applikationen die Katalysatoren, insbesondere Enzyme eine hohe Aktivität und Effektivität aufweisen sollten. Neben diesen beiden Kenndaten garantieren immobilisierte Biokatalysatoren mechanische und betriebliche Stabilität sowie ein Recycling des Biokatalysators. Somit bieten sie sowohl ökonomische als auch ökologische Vorteile.

Für eine effektive Produktion der FOS in einem kontinuierlich betriebenen Verfahren ist die Rückhaltung der Fructosyltransferase eine notwendige Voraussetzung. Um dieses zu realisieren, wurde die Fructosyltransferase immobilisiert. Dabei wurden Bedingungen für eine ausreichende Biokatalysatorstabilität ermittelt sowie eine Reihe von Trägermaterialien untersucht.

In der Literatur finden sich Beispiele für die Immobilisierung verschiedener Fructosyltransferasen beziehungsweise die Adsorption an verschiedene Trägermaterialien, wie z.B. Hydroxylapatit [Chambert und Petit-Glatron, 1993; Jang et al., 2000; Le Gorrec et al., 2002], Anionenaustauscher DEAE 52 Cellulose [Cheetham et al., 1989; Rathbone et al., 1986], Kieselerde [Smith et al., 1982] und Chitosanderivaten [Kono et al., 1994].

In dieser Arbeit wurden für die Immobilisierung der Fructosyltransferase drei Methoden angewendet: kovalente Bindung an den Epoxyträger Sepabeads® EC-EP (Resindion), Adsorption an Bentonit bzw. Hydroxylapatit und Einschluss nach Adsorption in eine Alginatmatrix.

5.2.1. Kovalente Bindung an Sepabeads® EC-EP (Resindion)

Eine kovalente Bindung des Enzyms an ein Trägermaterial kann zu einer maximalen Retention des Enzyms führen. Durch Bindung an mehreren Punkten („multipoint covalent attachment“) kann die eingeschränkte Beweglichkeit des Enzyms zu einer deutlich erhöhten Stabilität führen [Mateo et al., 2006]. Allerdings kann eine Immobilisierung durch kovalente Bindung auch zu drastischen Aktivitätsverlusten führen, da sie einen großen Einfluss auf die räumliche Struktur des Enzyms haben kann [Gemeiner, 1992; Taylor, 1991].

Die kovalente Bindung der Fructosyltransferase an ein funktionalisiertes Trägermaterial wurde an Sepabeads® EC-EP der Firma Resindion untersucht. Dabei handelt es sich um ein hochporöses, hydrophiles Polymethacrylat, das sich durch mechanische und chemische Stabilität auszeichnet [Resindion].

Abbildung 5.6 und 5.7 zeigen, dass die Fructosyltransferase *SacB* an Sepabeads® EC-EP gebunden wird. Sowohl die Enzymaktivität als auch der Proteingehalt nehmen mit der Zeit im Überstand ab. Nach 120 min ist im Überstand keine Enzymaktivität mehr zu detektieren, was für eine vollständige Bindung der *SacB* an den Epoxyträger spricht.

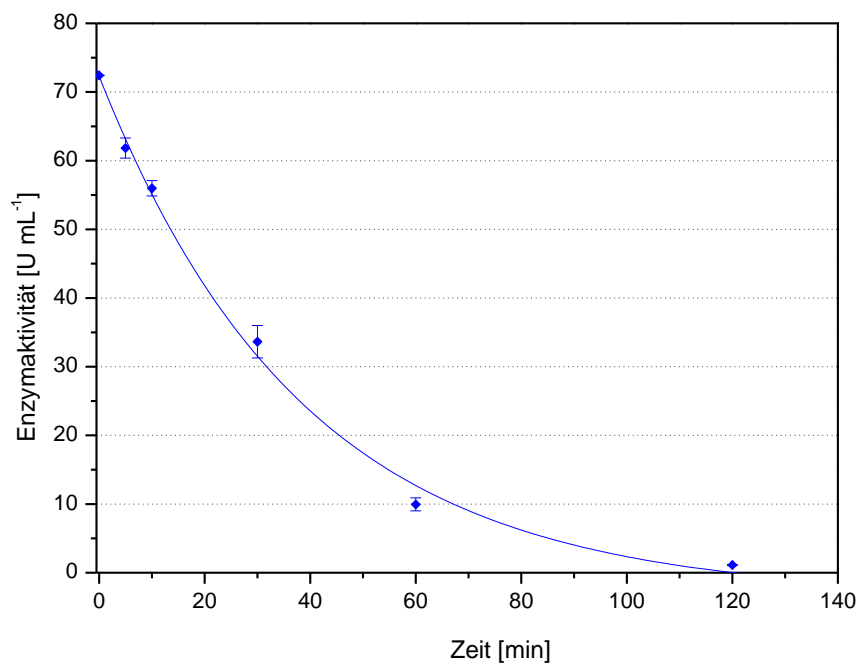


Abb. 5.6 Aktivität der *SacB* im Überstand während der kovalenten Bindung an Sepabeads® EC-EP

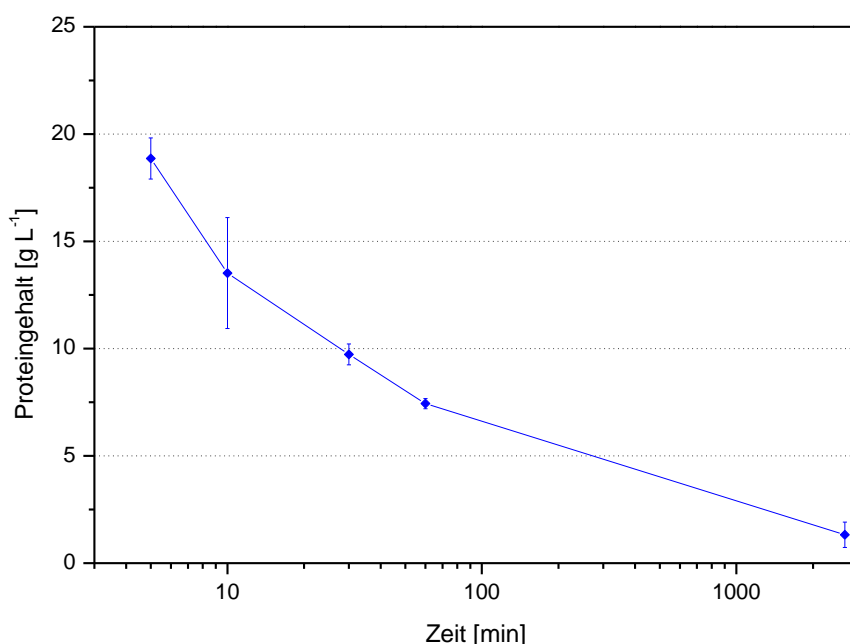


Abb. 5.7 Proteingehalt des Überstands während der kovalenten Bindung an Sepabeads® EC-EP

Aktivitätstests mit den Immobilisaten lieferten jedoch keine Enzymaktivität. Eine Ursache für die inaktiven Immobilisate könnte darin liegen, dass das Enzym mit mehreren Aminogruppen so an den Epoxyträger gebunden hat, dass es zu inaktivierenden Konformationsänderungen bzw. einer Blockierung des aktiven Zentrums kommt. Platková et al. (2006) beschrieben ebenfalls die Immobilisierung einer Fructosyltransferase (aus *Aureobasidium pullulans**) an den Epoxyträger Sepabeads® EC-EP, die zu Immobilisaten mit einer Restaktivität von kleiner 5 % führte. Ghazi et al. (2005) berichten von einer erfolgreichen Immobilisierung der Fructosyltransferase aus *Aspergillus aculeatus* an Sepabeads® EC-EP, wobei keine reine Fructosyltransferaselösung verwendet wurde, sondern das kommerzielle Enzympräparat Pectinex Ultra SP-L kovalent an den Träger gebunden wurde. Es finden sich weitere Beispiele in der Literatur, die die Immobilisierung anderer Enzyme, wie z.B. der Rinder-Enterokinase oder die Lipase von *Candida rugosa*, an dieses Trägermaterial beschreiben, die zu hohen Restaktivitäten führten [Knežević-Jugović et al., 2008; Kubitzki et al., 2008]. Für die kovalente Bindung der *SacB* aus *Bacillus megaterium* ist dieses Trägermaterial allerdings ungeeignet. Daher war die Suche nach einer anderen Immobilisierungsmethode des Enzyms erforderlich.

5.2.2. Adsorption an Bentonit bzw. Hydroxylapatit

Die Adsorption von Proteinen an feste Träger zählt zu den ältesten Methoden der Enzymimmobilisierung.

Im Allgemeinen findet die Adsorption von Proteinen an Trägermaterialien in einem Zweiphasensystem statt. In der flüssigen Phase befindet sich das im Lösungsmittel gelöste Protein, die feste Phase wird durch das Trägermaterial gestellt. Als Lösungsmittel für das Protein werden Pufferlösungen unterschiedlicher Zusammensetzung verwendet.

Die Adsorption der Fructosyltransferase *SacB* wurde sowohl an den Träger Bentonit als auch an Hydroxylapatit untersucht. Neben dem Träger besitzt auch das Enzym-Träger-Verhältnis einen maßgeblichen Einfluss auf die Aktivität des Immobilisats und der Proteinbeladung der Träger [Mateo et al., 2007]. Daher wurde die Adsorption der Fructosyltransferase an Bentonit bzw. Hydroxylapatit mit unterschiedlichen Verhältnissen von Träger zu Enzym durchgeführt. Die Immobilisierung des Enzyms erfolgte bei pH 6,6, dem pH-Optimum der nativen Fructosyltransferase [Homann, 2009]. Da eine maximale Adsorption bei niedrigen Temperaturen begünstigt ist [Atkins, 2010] betrug die Temperatur stets 4 °C.

Die Ergebnisse für die Adsorption der Fructosyltransferase *SacB* auf den Trägern Bentonit bzw. Hydroxylapatit sind in Abbildung 5.8 dargestellt. Die erhaltenen Adsorptionsisothermen entsprechen dem Langmuir-Typ.

Der Vergleich beider Adsorbentien über die jeweiligen Langmuir-Isothermen zeigt eine deutlich größere Beladungskapazität für Bentonit, die ungefähr achtmal so hoch ist wie für Hydroxylapatit ($q_{\max} = 0,5$ gegen $q_{\max} = 0,07$). Der Sorptionskoeffizient von Bentonit ist etwa dreimal so hoch verglichen mit dem von Hydroxylapatit.

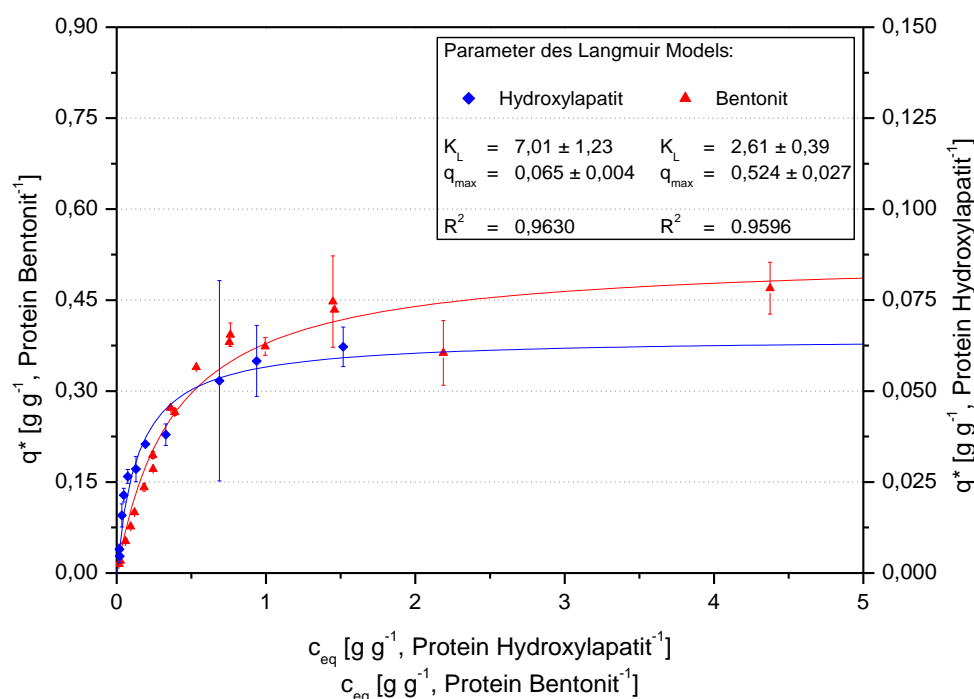


Abb. 5.8 Adsorptionsisotherme der *SacB* an Bentonit bzw. Hydroxylapatit

Die Arbeit von König (2001) lieferte ebenfalls keine hohen Immobilisierungsausbeuten (28 %) und Restaktivitäten (5 %) bei der Adsorption einer Levansucrase an Hydroxylapatit. In der vorliegenden Arbeit wurden wie bei König (2001) die Adsorptionsversuche mit Enzymrohextraktlösung durchgeführt. Bei Chambert und Petit-Glatron (1993) und Jang et al. (2000) wurde aufgereinigte Levansucrase an Hydroxylapatit adsorbiert. Dabei lagen die Immobilisierungsausbeuten bei 100 % bzw. 60 % und die Restaktivität bei 70 %. Daraus kann geschlossen werden, dass bei der Adsorption an Hydroxylapatit bei Verwendung von Enzymrohextraktlösungen unspezifische Bindungen bzw. eine begrenzte Bindungskapazität des Trägers auftreten. Die in dem Rohextrakt befindlichen „Fremdproteine“ binden unter Umständen fester an den Träger als die Fructosyltransferase.

Des Weiteren berichten Hughes Wassell et al. (1995) von dem Einfluss der Phosphationenkonzentration bei der Adsorption von BSA an Hydroxylapatit. Veränderungen der Pufferbedingungen führten zur Desorption des Enzyms, z.B. desorbierten 99,1 % BSA bei der Anwesenheit von 0,33 M Na_2HPO_4 innerhalb von 2 h. Da die Adsorptionsversuche der Fructosyltransferase an Hydroxylapatit bzw. Bentonit in Sörensenpuffer durchgeführt wurden, kann die Anwesenheit von Phosphationen im Puffer als Ursache für die geringere Beladung des Hydroxylapatitträgers mit der Fructosyltransferase gesehen werden.

Des Weiteren zeigen die Adsorptionsuntersuchungen mit dem Enzym Dextranase ebenfalls eine wesentlich geringere Beladungskapazität an Hydroxylapatit ($0,032 \text{ g g}^{-1}$) im Vergleich zu Bentonit ($0,8 \text{ g g}^{-1}$) [Erhardt und Jördening, 2007].

Aktivitätsmessungen für auf Bentonit adsorbierter Fructosyltransferase ergaben eine maximale Aktivitätserhaltung von nahezu 100 %, bezogen auf natives Enzym, während für solches Enzym, das auf Hydroxylapatit immobilisiert ist, nur eine Restaktivität von 40 % gefunden wurde.

Ziel der Immobilisierung der Fructosyltransferase ist es, die Rückhaltung des Enzyms beim Einsatz in einem kontinuierlichen System zu gewährleisten. Die beschriebenen Adsorptionsversuche der Fructosyltransferase an Bentonit bzw. Hydroxylapatit haben gezeigt, dass Bentonit der geeignetere Träger zur Adsorption des Enzyms ist. Daher wurden alle weiteren Untersuchungen hinsichtlich der Immobilisierung der Fructosyltransferase mit Bentonit durchgeführt.

In Abbildung 5.9 ist die Aktivitäts-Adsorptionsisotherme der *SacB* an Bentonit nach Langmuir dargestellt. Aus dieser wurde eine maximale Beladungsaktivität von $111 \text{ U mg}^{-1}_{\text{Träger}}$ ermittelt. Die Immobilisierungsausbeute betrug dabei rund 20 %. Eine vollständige Immobilisierung (Ausbeute nahe 100 %) konnte bei einer Beladung von $44 \text{ U mg}^{-1}_{\text{Träger}}$ erzielt werden. Die Literatur liefert für die Adsorption der aufgereinigten Levansucrase aus *Zymomonas mobilis* an Hydroxylapatit bei einer Immobilisierungsausbeute von 50 % eine Aktivität von $20 \text{ U g}^{-1}_{\text{Träger}}$ bzw. eine maximale Beladungskapazität von $60 \text{ U g}^{-1}_{\text{Träger}}$ bei einer Immobilisierungsausbeute von lediglich 30 % [Jang et al., 2000].

Dies unterstreicht noch einmal, dass Bentonit als Träger zur Adsorption der Fructosyltransferase geeigneter ist als Hydroxylapatit.

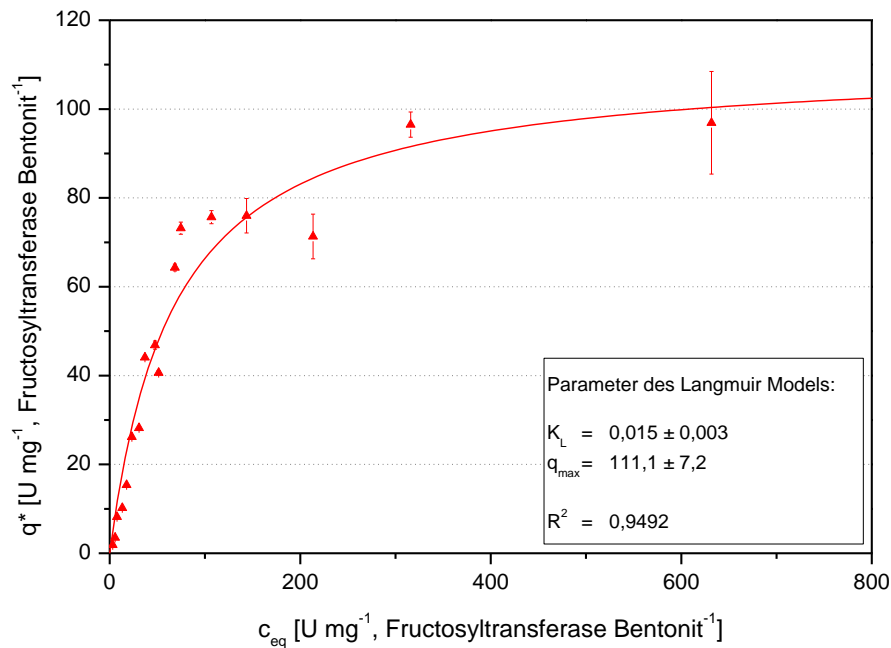


Abb. 5.9 Aktivitäts-Adsorptionsisotherme der *SacB* an Bentonit

Für einen kontinuierlichen Einsatz ist nicht nur eine erfolgreiche Adsorption der Fructosyltransferase entscheidend, sondern auch die Stabilität der Adsorption.

Abbildung 5.10 stellt die Ergebnisse der Auswaschversuche von adsorbierter Fructosyltransferase aus Bentonit dar. Es zeigt sich, dass nur sehr hohe Enzymkonzentrationen zu Auswaschungseffekten des Enzyms vom Adsorber führen. Bei geringeren Konzentrationen bleibt die Fructosyltransferase fast vollständig adsorbiert.

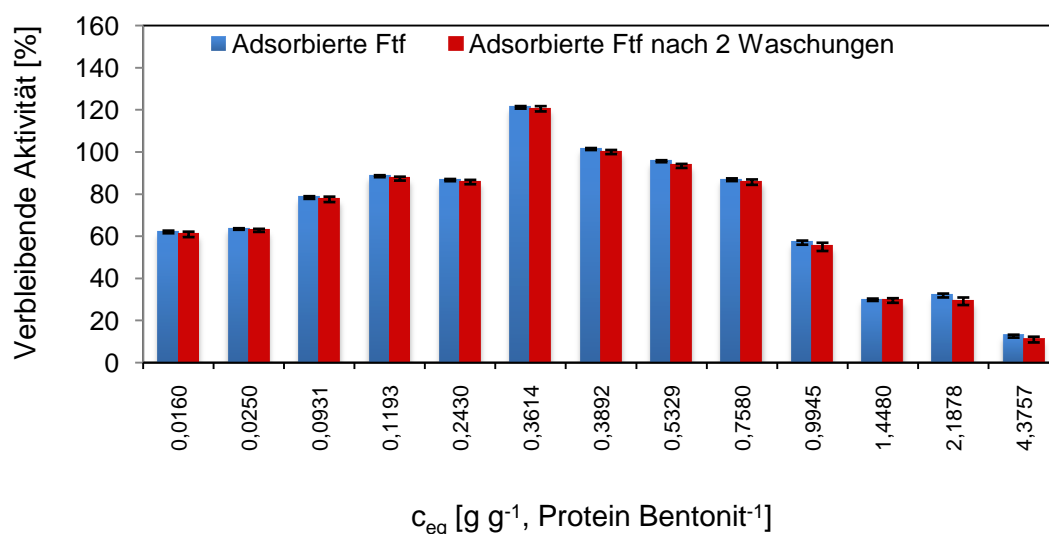


Abb. 5.10 Aktivität der an Bentonit adsorbierten *SacB* nach zwei Waschungen

Die Adsorption der *SacB* an den Träger wurde mit unaufgereinigter Enzymlösung durchgeführt. Zur Auswertung der Adsorption wurden sowohl die Enzymaktivität als auch der Proteingehalt der Adsorbate, der Adsorptionsüberstände und der Enzymreferenzlösungen ermittelt. Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte über die Methode nach Bradford (1976). Mit dieser ist keine Differenzierung zwischen der *SacB* und den Proteinen des Expressionsorganismus möglich, so dass im Adsorptionsüberstand gemessenes Protein nicht zwangsläufig auf nicht adsorbierte *SacB* geschlossen werden kann. Ein Zusammenhang zwischen gemessenem Proteingehalt und ermittelter Enzymaktivität im Adsorptionsüberstand sollte Aufschluss darüber geben, wie spezifisch die Adsorption der *SacB* an Bentonit erfolgt.

Abbildung 5.11 stellt diesen Zusammenhang dar. Im Überstand gemessenes Protein bzw. ermittelte Enzymaktivität kann zum einen auf „Fremdproteine“ und zum anderen auf nicht adsorbiertes Enzym zurückgeführt werden.

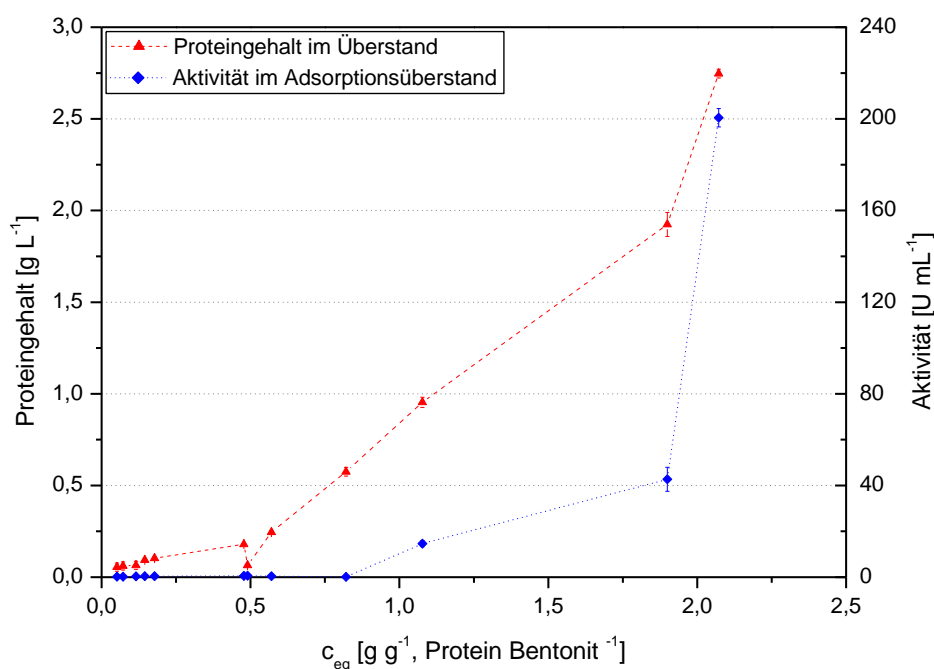


Abb. 5.11 Aktivität und Proteingehalt im Überstand (nicht immobilisierte *SacB*)

Aus Abbildung 5.11 wird ersichtlich, dass im Überstand kein linearer Zusammenhang zwischen Proteingehalt und Enzymaktivität besteht. Daraus lässt sich die Vermutung aufstellen, dass die Adsorption an Bentonit sehr spezifisch bezüglich der *SacB* ist. Um diese Vermutung zu verifizieren, wurde exemplarisch das Immobilisat mit $0,36 \text{ g}_{\text{Protein}} \text{ g}_{\text{Bentonit}}^{-1}$

mittels SDS-PAGE untersucht. Diese ermöglicht eine Analyse der Proteine, indem diese in einem elektrischen Feld getrennt werden.

In Abbildung 5.12 ist die Proteinausgangslösung und der entsprechende Überstand nach der Adsorption an Bentonit in unterschiedlichen Proteinverdünnungen aufgetrennt wurden. Die Fructosyltransferase *SacB* aus *Bacillus megaterium* hat ein Molekulargewicht von 52 kDa [Biedendieck, 2007]. Diese Bande ist auf dem SDS-Gel sehr deutlich zu erkennen (rotes Kästchen). Der Vergleich der Auftrennung des Proteingemischs vor der Adsorption (Enzymlösung; $E_{0,36}$) mit dem Proteingemisch nach der Adsorption (Adsorptionsüberstand; $\ddot{U}_{0,36}$) zeigt, dass nach der Adsorption keine Bande der *SacB* detektiert wird. Lediglich die Banden der „Fremdproteine“ sind nachweisbar. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die *SacB* sehr spezifisch an Bentonit adsorbiert wird und somit die Adsorption an den Träger Bentonit gleichzeitig zu einer Aufreinigung der *SacB* aus der Zellrohextraktlösung führt.

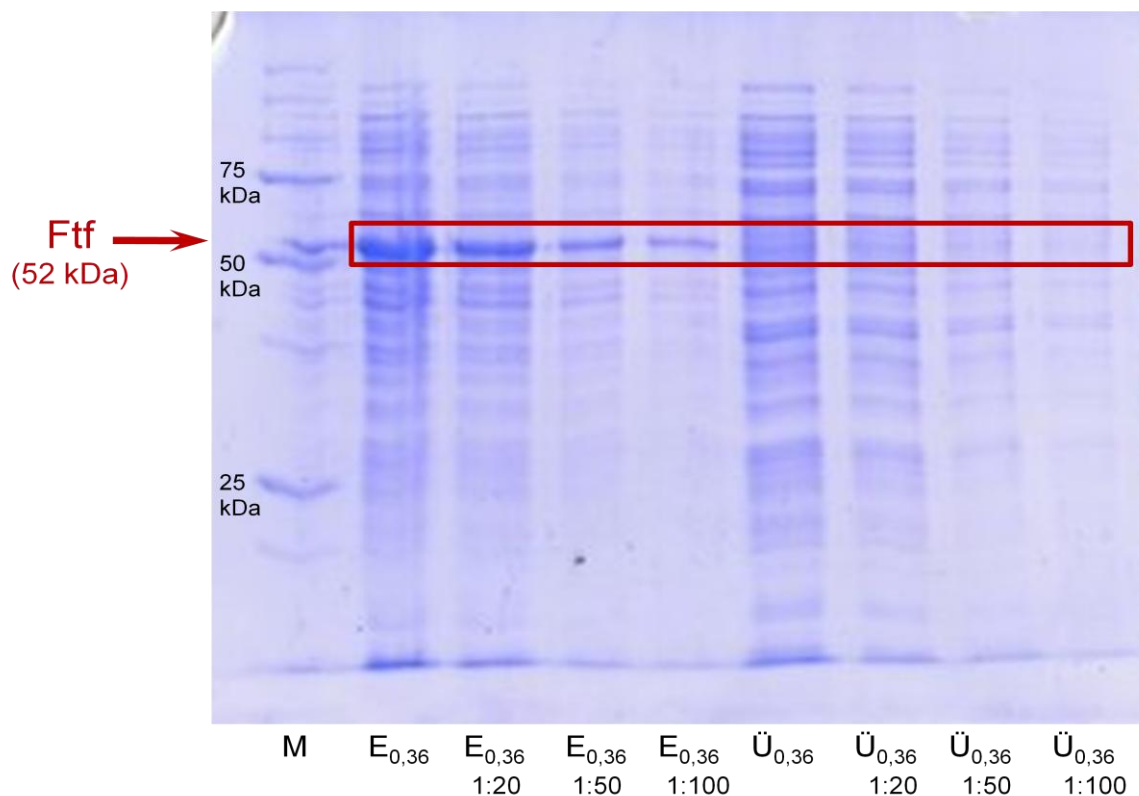


Abb. 5.12 SDS-PAGE der Enzymlösung (E) bzw. des Adsorptionsüberstandes (\ddot{U}) nach der Adsorption an Bentonit ($c_{eq} = 0,36 \text{ g}_{\text{Protein}} \text{ g}^{-1}_{\text{Bentonit}}$) mit M: Precision Plus Protein Unstained Standard (Bio-Rad) (SDS-PAGE: 12 % Trenngel, 4 % Sammelgel)

Somit ist eine vorherige Aufreinigung der Fructosyltransferase aus dem Enzymrohextrakt nicht notwendig, um diese erfolgreich an den Träger Bentonit adsorbieren zu können.

5.2.3. Matriceinhüllung der Fructosyltransferase

Für einen Betrieb im kontinuierlichen System ist es wichtig, die Rückhaltung des Enzyms zu gewährleisten. Gleichzeitig stellt die Einkapselung von Enzymen eine hervorragende Methode zur Immobilisierung dar, um das Enzym vor schädlichen äußeren Einflüssen wie mechanischen Stress zu schützen.

Ein direkter Einschluss der *SacB* in eine Alginatmatrix ist aufgrund ihres geringen Molekulargewichts von 52 kDa nicht möglich. Die Matrix des Alginatgels verfügt über so große Poren, dass die Enzymmoleküle darin nur schwer quantitativ physikalisch zurückgehalten werden können. Dieses Problem lässt sich umgehen, indem das Enzym zuvor an den Träger Bentonit gebunden wird.

Da es sich bei der an Bentonit adsorbierten *SacB* um sehr kleine Partikel handelt, wurde die Größe der Partikel erhöht, indem die Bentonit-Immobilisate in eine Alginatmatrix eingeschlossen wurden. Alginat bietet den Vorteil, dass es für den Einsatz im Lebensmittelbereich geeignet und billig ist.

Abbildung 5.13 zeigt die Immobilisierungsapparatur, die zur Herstellung der Alginatperlen verwendet wurde (schematischer Aufbau siehe Kapitel 4.6.4.1.). Dazu wird Alginatlösung zusammen mit Microsil® und der adsorbierten *SacB* als Vorlage in die Apparatur gegeben und in CaCl_2 -Lösung getropft, in der sich infolge der Vernetzung des Alginats aus den Tropfen Perlen bilden (ionotrope Gelbildung).

Die Aufgabe von Druckluft von oben bzw. das Umspülen der Kanülen mit Druckluft im unteren Teil erlauben die Herstellung von Perlen verschiedener Größe. In Hinblick auf die Vermeidung von Stofftransportlimitierungen ist es entscheidend, möglichst kleine Partikeldurchmesser realisieren zu können.

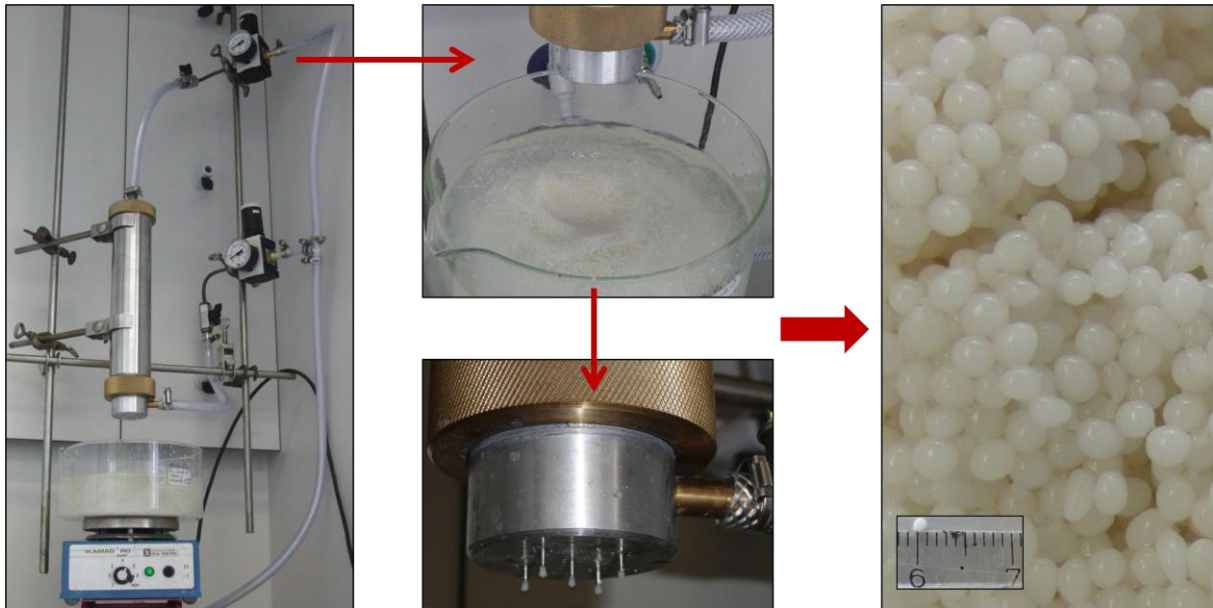


Abb. 5.13 Herstellung von Bentonit-Alginat-Immobilisaten der *SacB*

Um zu verhindern, dass die Alginatperlen zu leicht sind und auf der Reaktionslösung aufschwimmen, wurde Microsil® (Quarzmehl; SiO_2) hinzugefügt, um die Dichte sowie die Druck- und Scherstabilität der Perlen zu erhöhen. Berensmeier et al. (2004) zeigte für die Immobilisierung der Dextranucrase in Alginat, dass Microsil® keinerlei Einfluss auf die Aktivität des Enzyms hat, verglichen mit der Enzymaktivität ohne Additiv in den Perlen.

Der Zusatz von Microsil® hatte neben einer Dichteerhöhung der Perlen auch positive Auswirkungen auf die Druckstabilität der Perlen. Ohne Zusatz wurden die Perlen sehr schnell weich, was sich negativ bei der Verwendung im kontinuierlichen Prozess auswirkte. Des Weiteren konnte weder ein Aufquellen noch ein Schrumpfen bzw. Auflösen der Perlen nach längerer Verwendung beobachtet werden (Abbildung 5.14).

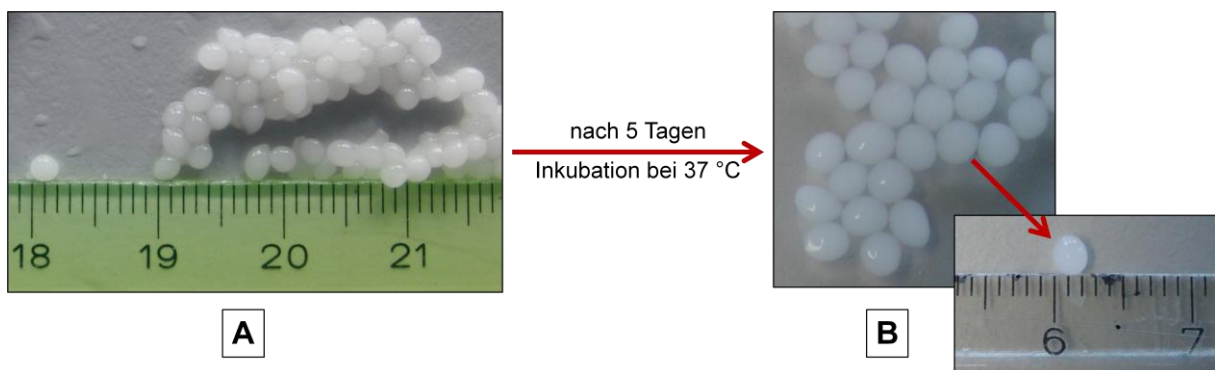


Abb. 5.14 Stabilität der Bentonit-Alginat-Immobilisate der *SacB* mit A: nach der Herstellung der Perlen und B: nach 5 Tagen Inkubation bei 37 °C in 0,5 M Sac-Lösung

Die Immobilisierung von Enzymen in Matrices birgt grundsätzlich die Gefahr, dass Diffusionslimitierung auftreten kann. Dies kann in einer Aktivitätsminderung der Immobilisate gegenüber dem freien Enzym resultieren. Einen großen Einfluss auf den Diffusionswiderstand hat dabei die Partikelgröße. Quirasco et al. (1999) erzielten bei der Immobilisierung von *Leuconostoc mesenteroides* eine Aktivitätssteigerung von 20 % durch Reduktion des Partikeldurchmessers von 4 auf 2 mm.

In der vorliegenden Arbeit ermöglichte die Immobilisierungsapparatur die Herstellung von Alginatperlen mit dem minimalen Durchmesser von 1,0-1,9 mm. Kleinere Partikelgrößen konnten mit der verwendeten Technik nicht realisiert werden. Die Wahl des geeigneten Partikeldurchmessers muss dabei sowohl die Handhabbarkeit (gute Sedimentation, gute Rückhaltung), den Druckverlust als auch den Effektivitätskoeffizienten, der Aussagen über die Stofftransporteigenschaften macht, berücksichtigen.

Die Immobilisierung der Fructosyltransferase *SacB* (Einschluss der adsorbierten Fructosyltransferase) lieferte eine Restaktivität von 80 ± 2 % verglichen mit der Aktivität des nativen Enzyms. Grundsätzlich konnte keine Veränderung im Produktspektrum festgestellt werden. Die Bentonit-Alginat-Immobilisate bildeten ebenso wie natives bzw. adsorbiertes Enzym die FOS sowie die Hydrolyseprodukte und kurzkettige FOS.

Alcalde et al. (1999) stellten bei der Synthese von Glucoseoligosacchariden mit Dextranucrase aus *Leuconostoc mesenteroides* ebenfalls ein unverändertes Produktspektrum bei nativem und immobilisiertem (Alginat) Enzymeinsatz fest.

Es konnten jedoch Unterschiede zwischen nativer und immobilisierter Fructosyltransferase in den Reaktionsraten zur Bildung der jeweiligen Produkte beobachtet werden. Die kinetischen Untersuchungen der nativen, adsorbierten und nach Adsorption eingeschlossenen *SacB* werden in Kapitel 5.3 diskutiert.

5.2.4. Kapitelzusammenfassung

Zur Etablierung einer kontinuierlichen Prozessführung wurde die Immobilisierung der Fructosyltransferase *SacB* (Rohextraktlösung) untersucht.

Die Immobilisierung der *SacB* an den Epoxyträger Sepabeads® EC-EP führte zur Inaktivierung des Enzyms, die vermutlich auf inaktivierende Konformationsänderungen bzw. einer Blockierung des aktiven Zentrums zurückzuführen ist.

Die Adsorption der *SacB* an die Träger Bentonit bzw. Hydroxylapatit liefert in beiden Fällen aktive Immobilisate. Für den Träger Bentonit wurde eine maximale Aktivitätserhaltung von 100 % gefunden, für Hydroxylapatit nur von 40 %. Auch der Vergleich der jeweiligen Langmuir-Isothermen zeigt eine deutlich größere Beladungskapazität für Bentonit als für Hydroxylapatit ($q_{\max} = 0,5$ gegen $q_{\max} = 0,07$). Der Sorptionskoeffizient von Bentonit ist etwa dreimal höher als der von Hydroxylapatit. Ausgehend von diesen Adsorptionsversuchen wurde Bentonit als geeigneter Träger zur Immobilisierung der *SacB* gewählt und für alle weiteren Untersuchungen verwendet.

Die Adsorption der *SacB* auf dem Träger Bentonit lieferte Immobilisate mit einer maximalen Beladungsaktivität von $111 \text{ U mg}^{-1}_{\text{Träger}}$ bei einer Immobilisierungsausbeute von 20 %. Eine vollständige Immobilisierung (Ausbeute nahe 100 %) konnte bei einer Beladung von $44 \text{ U mg}^{-1}_{\text{Träger}}$ erzielt werden.

Der anschließende Einschluss der Bentonit-Immobilisate in Alginat liefert aktive Immobilisate ($\varnothing = 1,0\text{-}1,9 \text{ mm}$) mit einer Restaktivität von $80 \pm 2 \%$, verglichen mit der Aktivität der nativen *SacB*. Durch den Zusatz von Microsil® konnte zum einem die Dichte der Perlen erhöht und zum anderen die Druckstabilität der Perlen verbessert werden. Ein negativer Einfluss auf die Aktivität des Enzyms konnte hingegen nicht beobachtet werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Immobilisierung der *SacB* in zwei aufeinanderfolgenden Schritten (1. Adsorption an Bentonit, 2. anschließender Einschluss in Alginat) zu Immobilisaten führt, die für den Einsatz im kontinuierlich betriebenen System zur Produktion von FOS geeignet sind.

5.3. Kinetische Untersuchungen der Fructosyltransferase

Die Kinetik eines Enzyms (nativ, immobilisiert) ist für den industriellen Einsatz von großer Bedeutung. Sie dient der quantitativen Beschreibung der Reaktionsparameter einer enzymatischen Reaktion unter Berücksichtigung der Prozessparameter wie z.B. Konzentration, Temperatur und pH-Wert. Dabei charakterisieren die kinetischen Parameter K_M (Michaelis-Menten-Konstante), k_{cat} (Wechselzahl) und v_{max} (maximale Reaktionsgeschwindigkeit) das Enzym hinsichtlich Substrataffinität, katalytische Effizienz und Reaktionsgeschwindigkeit.

Die Charakterisierung der *SacB* hinsichtlich pH- und Temperaturoptimum sowie die Ermittlung der kinetischen Parameter der Substratreaktion erfolgte in der Arbeit von Homann et al. (2007) [Homann, 2009].

In dieser Arbeit sollten die kinetischen Parameter der Akzeptorreaktion sowohl für das native als auch für das immobilisierte (Bentonit- und Bentonit-Alginat-Immobilisate) Enzym ermittelt werden.

5.3.1. Erstellung eines kinetischen Modells mit der Software ModelMaker3[®]

Für die Synthese des Galacturonsäure-Fructosids sind zwei Substrate nötig: Saccharose (Donor) und Galacturonsäure (Akzeptor). Für die Beschreibung der Zwei-Substrat-Reaktionen unterscheidet man entsprechend der Nomenklatur nach Cleland (1963a-c) zwischen „Sequenziellen-“ und „Ping-Pong-Mechanismus“. Für die Fructosyltransferase ist bekannt, dass die Reaktionen nach dem Ping-Pong-Mechanismus stattfinden [André et al., 2003; Chambert et al., 1974; Homann, 2009; Seibel et al., 2006c]. Daher wurde Gleichung 2.5 (Kapitel 2.4.2.) für den Ping-Pong-Mechanismus angepasst (Gleichung 5.1) und in erweiterter Form für die kinetische Beschreibung der Akzeptorreaktion mit Galacturonsäure eingesetzt.

$$v = v_{max} \cdot \frac{[A] \cdot [B]}{K_{M,A} \cdot [B] + K_{M,B} \cdot [A] + [A] \cdot [B]} \quad (5.1)$$

Zur Beschreibung der Akzeptorreaktion und Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen zur Produktion des Galacturonsäure-Fructosids wurde ein kinetisches Modell entwickelt, das neben der Bestimmung der kinetischen Parameter der Akzeptorreaktion auch

die Hydrolyse und Polymerbildung berücksichtigt. Die kinetischen Konstanten werden dabei durch Integration nach Runge-Kutta in Kombination mit dem Simplexalgorithmus zur Parameteroptimierung ermittelt (Programm: ModelMaker3[®]; Cherwell Scientific Publishing Ltd.).

Abbildung 5.15 stellt die Verknüpfung der einzelnen Terme des kinetischen Reaktionsmodells zur Beschreibung der kinetischen Parameter der Akzeptorreaktion mit Galacturonsäure dar. Die Bildung des Galacturonsäure-Fructosids wird durch die „roten Verknüpfungen“, die Hydrolyse der Saccharose durch die „dunkelblauen Verknüpfungen“ und die Polymerbildung durch die „hellblaue Verknüpfung“ dargestellt. Die Hydrolyse des Galacturonsäure-Fructosids („gelb, gepunktete Verknüpfung“) müsste in dem Reaktionsmodell ebenfalls berücksichtigt werden. Allerdings konnten keine Hydrolyseexperimente mit dem Galacturonsäure-Fructosid durchgeführt werden, da für dieses keine quantitativen Mengen in reiner Form zur Verfügung standen. Daher wurde bei der Erstellung des kinetischen Modells die Hydrolyse des Produktes nicht berücksichtigt.

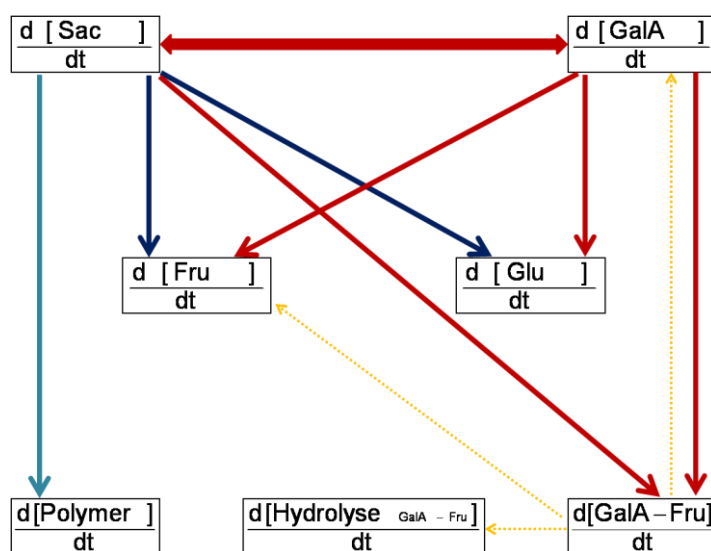


Abb. 5.15 Kinetisches Reaktionsmodell zur Beschreibung der kinetischen Parameter der Akzeptorreaktion unter Berücksichtigung der Polymerbildung

Im folgendem soll die Reaktionsgleichung der **Konzentrationsabnahme der Saccharose** erläutert werden. Bei der Transfructosylierung des Akzeptors Galacturonsäure durch die Fructosyltransferase *SacB* wird die Abnahme der Saccharosekonzentration durch drei Terme beschrieben (Gleichung 5.2):

$$\frac{d[\text{Sac}]}{dt} = - \text{Term "AKX"} - \text{Term "HYD"} - \text{Term "POLY}_{\text{Sac}}" \quad (5.2)$$

1) Akzeptorreaktion (Gleichung 5.3):

Zur Bildung des Akzeptorproduktes wird Saccharose mit Galacturonsäure umgesetzt. Daher wird diese Reaktion durch eine Gleichung einer „Doppel-Substrat-Kinetik“ beschrieben. Dafür werden folgende kinetische Parameter definiert: maximale Reaktionsgeschwindigkeit der Akzeptorreaktion V_{Akx} sowie die Michaelis-Menten-Konstanten der Saccharose $K_{\text{M,Akx-Sac}}$ bzw. der Galacturonsäure $K_{\text{M,Akx-GalA}}$ für die Bildung des Akzeptorproduktes.

$$\text{Term "AKX"} = \frac{V_{\text{Akx}} \cdot [\text{Sac}] \cdot [\text{GalA}]}{K_{\text{M,Akx-Sac}} \cdot [\text{GalA}] + K_{\text{M,Akx-GalA}} \cdot [\text{Sac}] + [\text{Sac}] \cdot [\text{GalA}]} \quad (5.3)$$

2) Hydrolyse (Gleichung 5.4)

Neben der Akzeptorreaktion findet auch die Hydrolysereaktion statt, wodurch ebenfalls eine Abnahme der Saccharosekonzentration verzeichnet wird. Diese wird durch folgende kinetische Parameter beschrieben: maximale Reaktionsgeschwindigkeit der Hydrolyse V_{Hyd} und der Michaelis-Menten-Konstante der Saccharose für die Hydrolyse $K_{\text{M,Hyd}}$.

$$\text{Term "HYD"} = \frac{V_{\text{Hyd}} \cdot [\text{Sac}]}{K_{\text{M,Hyd}} + [\text{Sac}]} \quad (5.4)$$

3) Polymerbildung (Gleichung 5.5)

Die Fructosyltransferase katalysiert auch die Bildung zu Polymeren. Diese Substratabnahme wird durch den dritten Term wiedergegeben. Dabei werden neben der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit der Polymerbildung V_{Poly} sowie die Michaelis-Menten-Konstante der Polymerreaktion $K_{\text{M,Poly}}$ auch ein Faktor n , der den durchschnittlichen Polymerisationsgrad beschreibt, definiert.

$$\text{Term "POLY}_{\text{Sac}}" = (n + 1) \cdot \frac{V_{\text{Poly}} \cdot [\text{Sac}]}{K_{\text{M,Poly}} + [\text{Sac}]} \quad (5.5)$$

Analog der Konzentrationsabnahme der Saccharose wird die **Abnahme der Galacturonsäure** zur Bildung des Akzeptorproduktes ebenfalls durch eine „Doppel-Substrat-Kinetik“ beschrieben (Gleichung 5.6).

$$\frac{d[\text{GalA}]}{dt} = - \frac{V_{\text{Akx}} \cdot [\text{Sac}] \cdot [\text{GalA}]}{K_{\text{M,Akx-Sac}} \cdot [\text{GalA}] + K_{\text{M,Akx-GalA}} \cdot [\text{Sac}] + [\text{Sac}] \cdot [\text{GalA}]} \quad (5.6)$$

Die **Bildung des Akzeptorproduktes Galacturonsäure-Fructosid** wird durch Gleichung 5.7 definiert.

$$\frac{d[\text{GalA-Fru}]}{dt} = \frac{V_{\text{Akx}} \cdot [\text{Sac}] \cdot [\text{GalA}]}{K_{\text{M,Akx-Sac}} \cdot [\text{GalA}] + K_{\text{M,Akx-GalA}} \cdot [\text{Sac}] + [\text{Sac}] \cdot [\text{GalA}]} \quad (5.7)$$

Zur Beschreibung der **zunehmenden Glucosekonzentration** müssen analog der Reaktionsgleichung für das Substrat Saccharose, drei Terme berücksichtigt werden (Gleichung 5.8).

$$\frac{d[\text{Glu}]}{dt} = + \text{Term "AKX"} + \text{Term "HYD"} + \text{Term "POLY}_{\text{Glu}} \quad (5.8)$$

Die Transfructosylierung des Akzeptors durch die Fructosyltransferase bewirkt eine Freisetzung von Glucose (Term „AKX“; Gleichung 5.3). Außerdem ist eine Zunahme der Glucosekonzentration auf Hydrolyse (Term „HYD“; Gleichung 5.4) und die Bildung von Polymeren (Term „Poly_{Glu}“; Gleichung 5.9) zurückzuführen.

$$\text{Term "POLY}_{\text{Glu}} = n \cdot \frac{V_{\text{Poly}} \cdot [\text{Sac}]}{K_{\text{M,Poly}} + [\text{Sac}]} \quad (5.9)$$

Die **Freisetzung von Fructose** ist auf die Hydrolysereaktion zurückzuführen und wird durch Gleichung 5.10 beschrieben.

$$\frac{d[\text{Fru}]}{dt} = \frac{V_{\text{Hyd}} \cdot [\text{Sac}]}{K_{\text{M,Hyd}} + [\text{Sac}]} \quad (5.10)$$

Die **Polymerbildung** wird durch Gleichung 5.11 definiert.

$$\frac{d[\text{Polymer}]}{dt} = (n - 1) \cdot \frac{V_{\text{Poly}} \cdot [\text{Sac}]}{K_{M,\text{Poly}} + [\text{Sac}]} \quad (5.11)$$

Mit Hilfe des Modells können die kinetischen Parameter der Akzeptorreaktion mit der Fructosyltransferase *SacB* ermittelt werden. Des Weiteren ermöglicht es eine Prognose über den zu erwartenden Umsatz sowie die Festlegung von Betriebspunkten für eine effiziente Synthese.

5.3.2. Kinetische Modellierungen von Batch-Versuchen

Als Daten-Input für die Parameteroptimierung mittels ModelMaker3[®] dienten dabei experimentelle Messreihen bei verschiedenen Donor-Akzeptor-Konzentrationsverhältnissen. Die Enzymkonzentration wurde für alle Versuche konstant gehalten (5 U mL⁻¹).

5.3.2.1. Bestimmung der kinetischen Parameter der nativen Fructosyltransferase

Abbildungen 5.16 bis 5.19 zeigen exemplarisch vier Beispiele für den Reaktionsverlauf der Galacturonsäure-Fructosid-Synthese bei verschiedenen Donor-Akzeptor-Konzentrationsverhältnissen zur Ermittlung eines kinetischen Parametersatzes der Reaktion mit nativer *SacB* (alle Daten der Sequenz von batch-Versuchen mit verschiedenen Donor-Akzeptor-Konzentrationsverhältnissen befinden sich im Anhang 10.2.3.1.).

Die Abbildungen (5.16 – 5.19) verdeutlichen, dass das entwickelte Reaktionsmodell die Konzentrationsverläufe der batch-Versuche sehr gut wiedergibt. Der Regressionskoeffizient aller batch-Versuche mit nativem Enzym ist 0,97.

Aus den batch-Versuchen wird deutlich, dass größere Abweichungen zwischen den experimentellen und den modellierten Daten insbesondere bei einem Konzentrationsverhältnis zwischen Donor und Akzeptor von $[\text{Sac}]:[\text{GalA}] > 1$ auftreten. In diesen Fällen wird die Synthese des Galacturonsäure-Fructosids überbetont. Die tatsächlichen Produktkonzentrationen liegen deutlich unterhalb des modellierten Konzentrationsverlaufs.

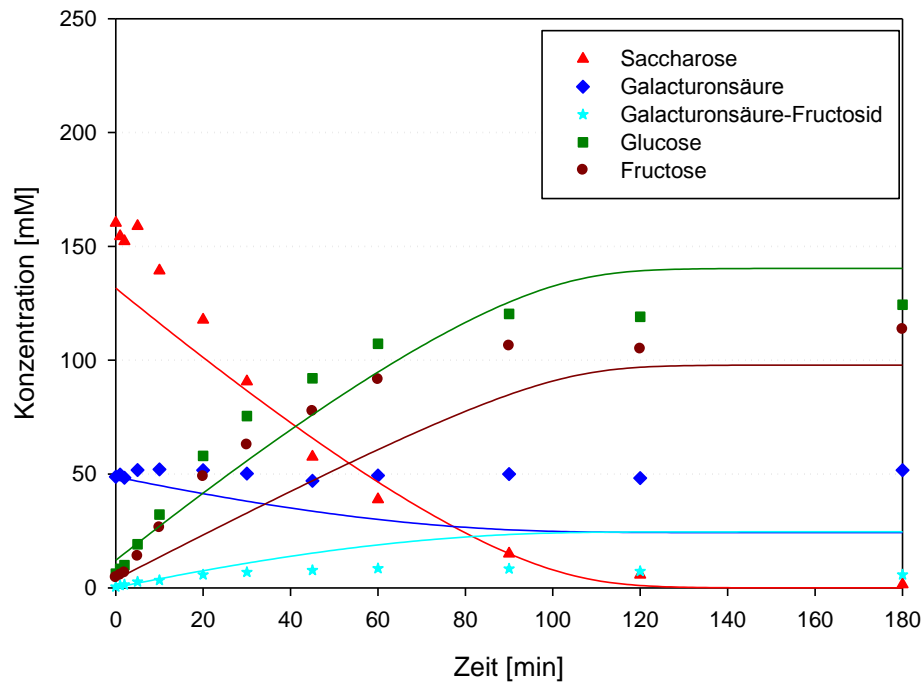


Abb. 5.16 Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit nativer SacB (Produktbildung, Hydrolyse und Polymerbildung) mit Modell aus 5.3.1. ($c_{\text{Sac}} = 100 \text{ mM}$; $c_{\text{GalA}} = 50 \text{ mM}$; $5,0 \text{ U mL}^{-1}$; $T = 37^\circ \text{C}$)

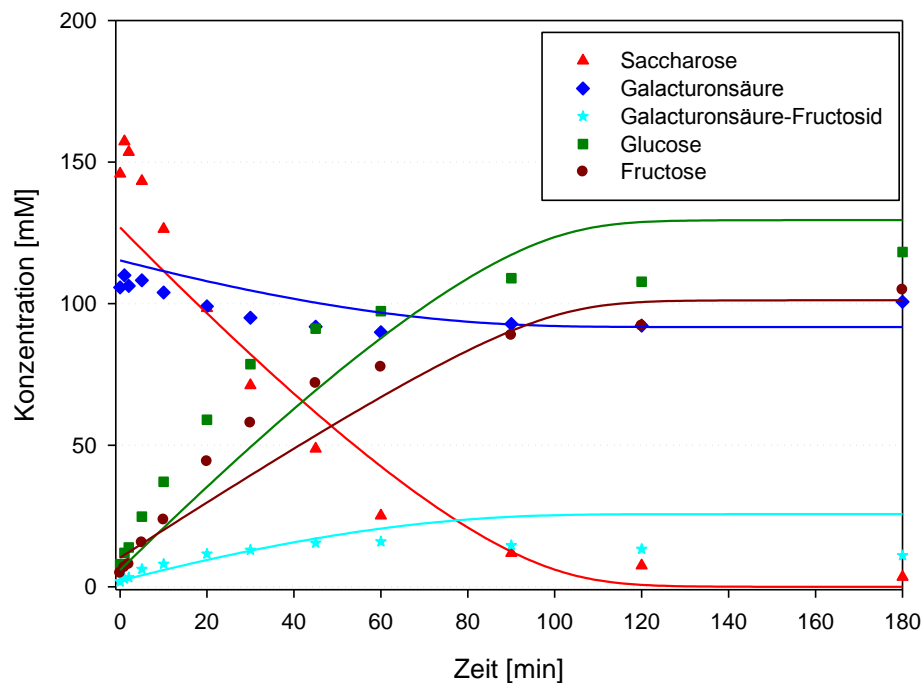


Abb. 5.17 Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit nativer SacB (Produktbildung, Hydrolyse und Polymerbildung) mit Modell aus 5.3.1. ($c_{\text{Sac}} = 100 \text{ mM}$; $c_{\text{GalA}} = 100 \text{ mM}$; $5,0 \text{ U mL}^{-1}$; $T = 37^\circ \text{C}$)

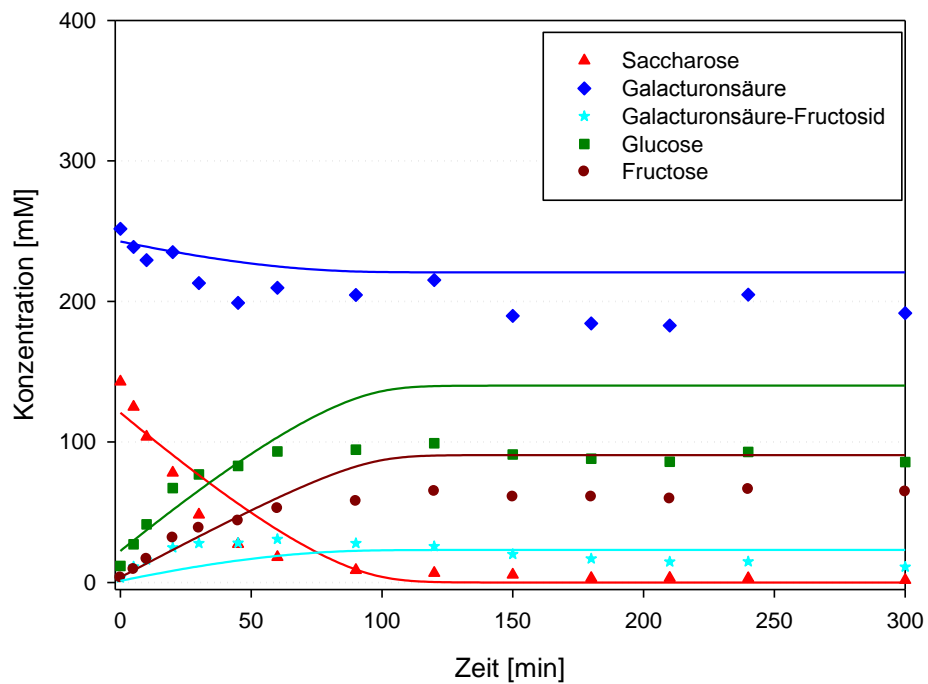


Abb. 5.18 Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit nativer SacB (Produktbildung, Hydrolyse und Polymerbildung) mit Modell aus 5.3.1. ($c_{\text{Sac}} = 100 \text{ mM}$; $c_{\text{GalA}} = 250 \text{ mM}$; $5,0 \text{ U mL}^{-1}$; $T = 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$)

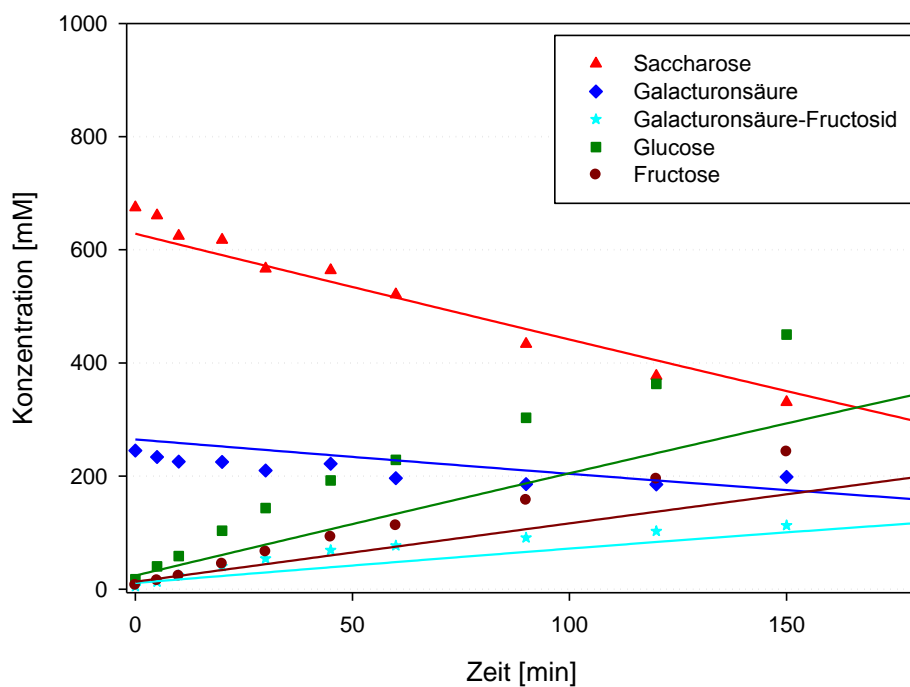


Abb. 5.19 Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit nativer SacB (Produktbildung, Hydrolyse und Polymerbildung) mit Modell aus 5.3.1. ($c_{\text{Sac}} = 500 \text{ mM}$; $c_{\text{GalA}} = 250 \text{ mM}$; $5,0 \text{ U mL}^{-1}$; $T = 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$)

Der Verlauf der experimentellen Daten in Abbildung 5.16 verdeutlicht, dass der Großteil der freigesetzten Glucose auf Hydrolyse zurückzuführen war, da das Konzentrationsverhältnis zwischen Glucose und Fructose bei fast 1:1 lag ($c_{\text{Glu}}(t=180\text{min}) = 124 \text{ mM}$; $c_{\text{Fru}}(t=180\text{min}) = 114 \text{ mM}$). Bei einer vollständigen Hydrolyse der Saccharose würde in der Reaktionslösung genauso viel Glucose wie Fructose vorliegen. Der mit dem Modell modellierte Produktanstieg ist höher als der experimentell ermittelte, das auf das zu geringe Verhältnis von Galacturonsäure zu Saccharose zurückzuführen sein könnte, wodurch die Hydrolyse gegenüber der Produktbildung stark bevorzugt scheint. Allgemein gilt, dass bei niedrigen Substratkonzentrationen die Hydrolyse überwiegt [Chambert et al., 1974; Meng und Fütterer, 2003].

Die Konzentrationsverläufe aller batch-Versuche (Abbildung 5.16 bis 5.19) zeigen einen Abbau des Produkts Galacturonsäure-Fructosid, insbesondere bei nur noch geringen Saccharosekonzentrationen im Reaktionsmedium. Daraus wird deutlich, dass der Produktabbau auf dessen Hydrolyse sowie vermutlich auf dessen Transfructosylierung zu höheren FOS in Folge von Substratmangel (Saccharosemangel) zurückzuführen ist.

Untersuchungen mit der Fructosyltransferase *SacB* aus *Bacillus subtilis* NCIMB 11871 zeigten, dass das Saccharose-Analog Galactosyl-Fructosid zu 52 % in Hydrolyseprodukte (zu 48 % in Transfructosylierungsprodukte) umgesetzt wurde. Galacturonsäure ist die oxidierte Form der Galactose. Daher könnte das Galacturonsäure-Fructosid ebenfalls als Saccharose-Analog der *SacB* als Substrat dienen.

Bei der Beschreibung des Modells wurde bereits darauf verwiesen, dass die Hydrolyse des Galacturonsäure-Fructosids nicht berücksichtigt werden konnte, so dass der Konzentrationsverlauf des FOS keine Produktabnahme durch dessen Hydrolyse wiedergibt. Das unterstreicht, dass die kinetische Beschreibung von Mehr-Substrat-Reaktionen, insbesondere die Inhibierungseffekte, durch die Vielzahl an Faktoren wesentlich schwieriger als bei Ein-Substrat-Reaktionen ist [Segel, 1975].

Die Synthese neuer FOS mit den Fructosyltransferasen *SacB* aus *Bacillus subtilis* bzw. *Bacillus megaterium* zeigten die besten Produktausbeuten zum entsprechendem Akzeptor-Fructosid bei einem Verhältnis zwischen Donor und Akzeptor von $[\text{Sac}]:[\text{Akzeptor}] = 1:2$. [Homann, 2009; Seibel et al., 2005 & 2006a und 2006b]. Ein Verhältnis von $[\text{Sac}]:[\text{Akzeptor}] > 1:2$ führt zu einer höheren Hydrolyseaktivität und damit verbunden zu einem sehr raschen Ansteigen der Glucose- bzw. Fructosekonzentrationen in der Produktionslösung. König (2001) zeigte für die Levansucrase aus *Zymomonas mobilis*, dass bereits bei einer Konzentration von 50 mM Glucose bzw. 500 mM Fructose eine

Produktinhibierung auftrat. Es finden sich weitere Beispiele für Levansucrasen aus verschiedenen Organismen, die Produktinhibierung durch Glucose aufweisen [Euzenat et al., 1998; Han et al., 2009; Hettwer et al., 1995; Lyness und Doelle, 1983; Szwengiel et al., 2007].

Um den Einfluss einer eventuell auftretenden Produktinhibierung durch Glucose zu berücksichtigen, wurde das Reaktionsmodell aus 5.3.1. um den entsprechenden Inhibierungsterm erweitert. Allerdings zeigten die Modellierungen der Konzentrationsverläufe keine nennenswerte Verbesserung.

Aus den Modellierungen der experimentellen Daten mit dem Reaktionsmodell ergaben sich für die native Fructosyltransferase *SacB* folgende kinetische Parameter der Akzeptorreaktion mit Saccharose und Galacturonsäure (Tabelle 5.3).

Tab. 5.3 Kinetische Parameter der nativen *SacB*; ermittelt durch Modellierungen mit dem in 5.3.1. erstelltem Reaktionsmodell; $R^2 = 0,967$

Parameter	Native <i>SacB</i>
$K_{M, Akx-Sac}$ [mM]	111 ± 1
$K_{M, Akx-GalA}$ [mM]	$2,28 \pm 0,03$
$K_{M, Hyd}$ [mM]	$8,3 \pm 0,2$
$K_{M, Poly}$ [mM]	49 ± 3
n [1]	$2,75 \pm 0,07$
V_{Akx} [mM min ⁻¹]	$0,742 \pm 0,002$
V_{Hyd} [mM min ⁻¹]	$1,048 \pm 0,001$
V_{Poly} [mM min ⁻¹]	$0,067 \pm 0,002$

Homann (2009) ermittelte für die *SacB* einen K_M von $6,6 \pm 1,1$ mM für die Hydrolyse [Homann et al., 2007]. Der über das Reaktionsmodell ermittelte K_M von $8,3 \pm 0,2$ mM befindet sich somit in der gleichen Größenordnung. Verglichen mit K_M -Werten anderer Fructosyltransferasen, z.B. für *SacB* aus *Bacillus subtilis* (13,5 – 40 mM [Schomburg et al., 2000 & 2002; BRENDA]), ist er relativ niedrig, was einer hohen Affinität dieses Enzyms zu dem Substrat Saccharose entspricht.

Der Vergleich der maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten für Hydrolyse und Produktbildung zeigt, dass die Hydrolyserate um 30 % höher ist. In der Gesamtheit der maximalen

Reaktionsraten fallen 56 % auf Hydrolyse, 40 % auf Produktbildung und 4 % auf Polymerbildung.

Untersuchungen mit der Fructosyltransferase *SacB* aus *Bacillus subtilis* NCIMB 11871 sowie deren Mutante *SacB_{A5}* zeigten, dass neben Saccharose auch eine Vielzahl von Saccharose-Analoga zur Synthese neuer FOS als Substrat von der Fructosyltransferase akzeptiert wird. Dabei konnten jedoch erhebliche Unterschiede hinsichtlich der Produktbildung und der Hydrolyse abhängig vom verwendeten Substrat beobachtet werden. Die Fructosyltransferase (Wildtyp) katalysierte die Umsetzung des Substrats Galactosyl-Fructosid zu 52 % in Hydrolyse und zu 48 % in Transfructosylierungsprodukte, wohingegen das Substrat Mannosyl-Fructosid zu 97 % Hydrolyse- und nur 3 % Transfructosylierungsprodukte lieferte [Beine et al., 2008]. Daraus wird deutlich, dass die Hydrolyserate nicht nur von der Herkunft der Fructosyltransferase sondern auch von der Art der Substrate abhängig ist.

Die Verwendung der Substrate Saccharose (Donor) und Galacturonsäure (Akzeptor) zur Synthese des FOS Galacturonsäure-Fructosid mit der Fructosyltransferase *SacB* aus *Bacillus megaterium* lieferte eine gute Transfructosylierungsrate mit 40 %.

5.3.2.2. Bestimmung der kinetischen Parameter der adsorbierten Fructosyltransferase

Die Abbildungen 5.20 bis 5.23 zeigen analog zu den Untersuchungen mit nativer *SacB* exemplarisch vier Konzentrations-Zeit-Kurven für den Reaktionsverlauf mit an Bentonit adsorbierter *SacB* zur Synthese des Galacturonsäure-Fructosids bei verschiedenen Donor-Akzeptor-Konzentrationsverhältnissen (Daten befinden sich im Anhang 10.2.3.2.).

Die Konzentrationsverläufe der Akzeptorreaktionen werden durch das Reaktionsmodell ebenfalls sehr gut erfasst. Die Optimierung der Parameter über die Modellierung aller batch-Versuche mit adsorbiertem Enzym liefert einen Regressionskoeffizienten von 0,94.

Analog zur Modellierung der nativen *SacB* wurden größere Abweichungen vom Modell vor allem bei Konzentrationsverhältnissen von $[Sac]:[Akzeptor] > 1$ beobachtet.

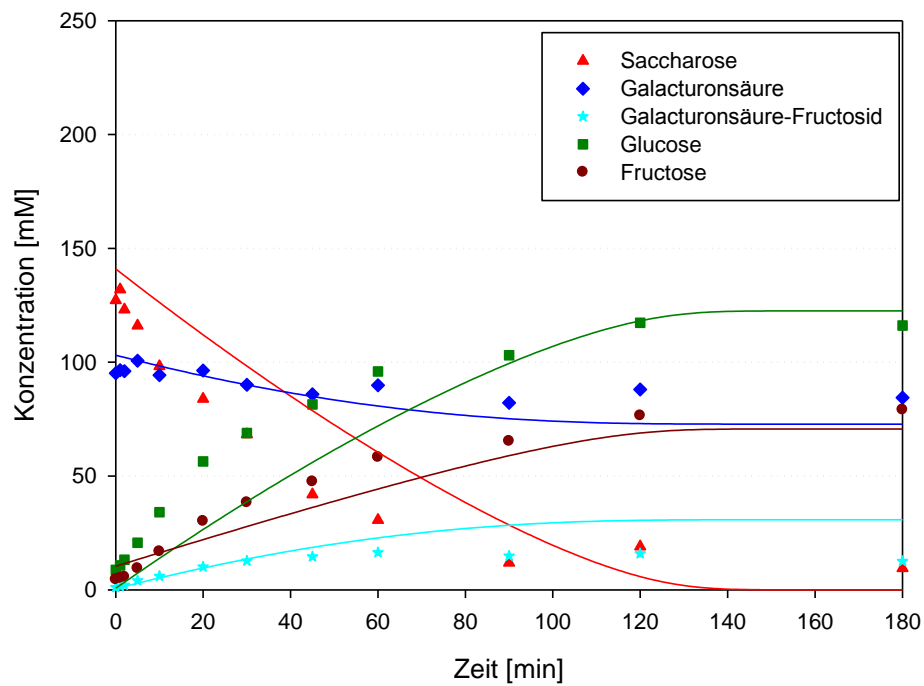


Abb. 5.20 Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit adsorbierter SacB (Produktbildung, Hydrolyse und Polymerbildung) mit Modell aus 5.3.1. ($c_{\text{Sac}} = 100 \text{ mM}$; $c_{\text{GalA}} = 100 \text{ mM}$; $5,0 \text{ U mL}^{-1}$; $T = 37 \text{ °C}$)

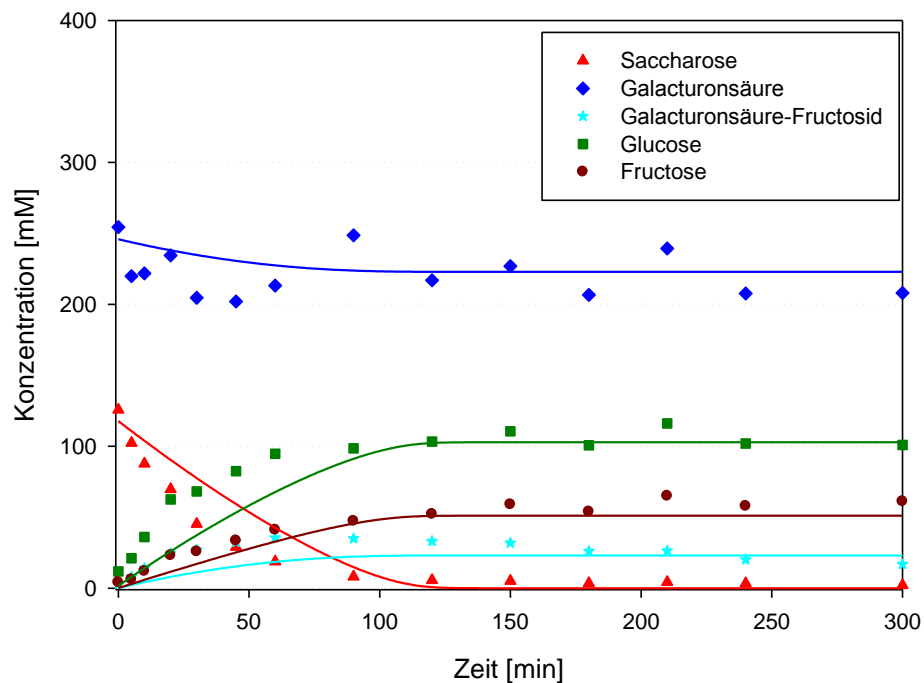


Abb. 5.21 Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit adsorbierter SacB (Produktbildung, Hydrolyse und Polymerbildung) mit Modell aus 5.3.1. ($c_{\text{Sac}} = 100 \text{ mM}$; $c_{\text{GalA}} = 250 \text{ mM}$; $5,0 \text{ U mL}^{-1}$; $T = 37 \text{ °C}$)

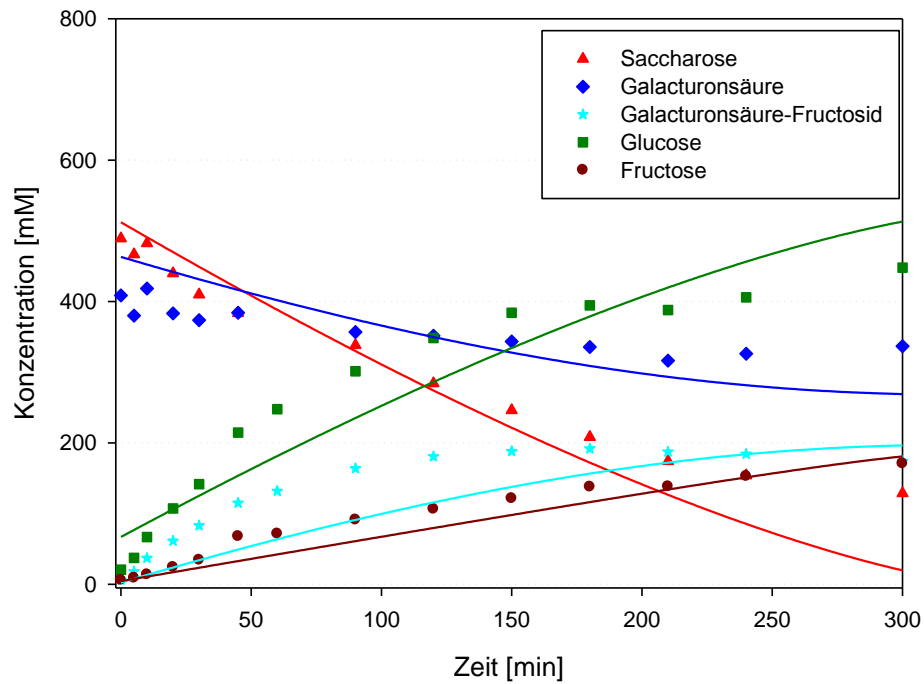


Abb. 5.22 Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit adsorbierter SacB (Produktbildung, Hydrolyse und Polymerbildung) mit Modell aus 5.3.1. ($c_{\text{Sac}} = 500 \text{ mM}$; $c_{\text{GalA}} = 500 \text{ mM}$; $5,0 \text{ U mL}^{-1}$; $T = 37^\circ\text{C}$)

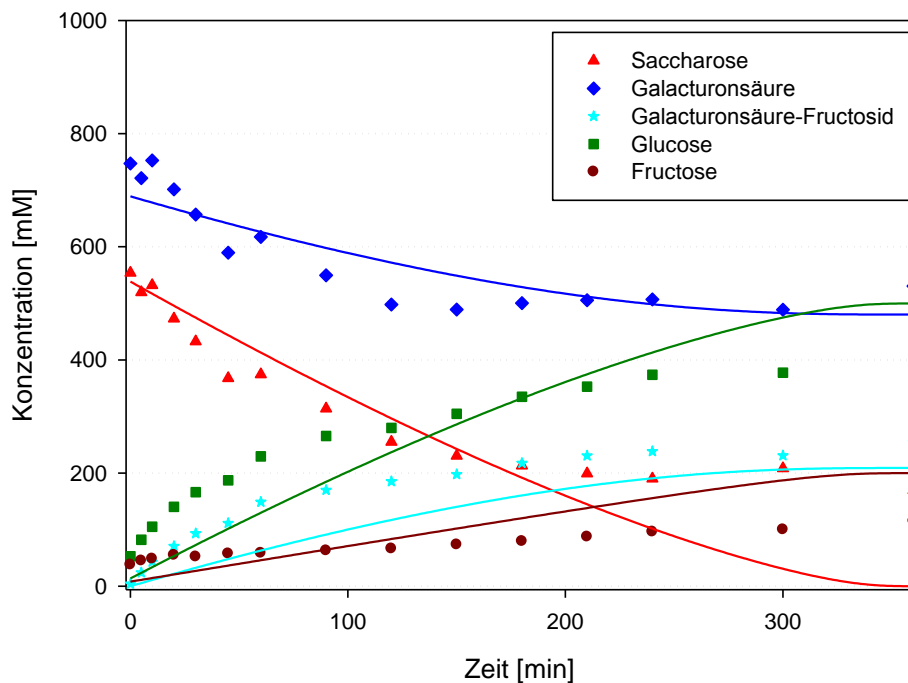


Abb. 5.23 Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit adsorbierter SacB (Produktbildung, Hydrolyse und Polymerbildung) mit Modell aus 5.3.1. ($c_{\text{Sac}} = 500 \text{ mM}$; $c_{\text{GalA}} = 750 \text{ mM}$; $5,0 \text{ U mL}^{-1}$; $T = 37^\circ\text{C}$)

Für die an Bentonit adsorbierte *SacB* ergaben sich für die Akzeptorreaktion die in Tabelle 5.4 gezeigten kinetischen Parameter. Dabei fällt auf, dass die adsorbierte *SacB* eine um 38 % geringere maximale Hydrolyserate bzw. eine um den Faktor 2,7 höhere maximale Produktbildungsrate im Vergleich zum nativen Enzym aufweist. Dies korreliert mit dem erhöhten K_M für die Hydrolysereaktion. Im Gegensatz zur nativen *SacB* überwiegt bei den Bentonit-Immobilisaten die Produktbildung mit 71 % (Hydrolyse: 23 %, Polymerbildung: 6 %).

Tab. 5.4 Kinetische Parameter der adsorbierten *SacB*; ermittelt durch Modellierungen mit dem in 5.3.1. erstelltem Reaktionsmodell; $R^2 = 0,941$

Parameter	Adsorbierte <i>SacB</i>
$K_{M, Akx-Sac}$ [mM]	427 ± 2
$K_{M, Akx-GalA}$ [mM]	$1,5 \pm 0,3$
$K_{M, Hyd}$ [mM]	$14,1 \pm 0,3$
$K_{M, Poly}$ [mM]	$2,4 \pm 0,3$
n [1]	$1,63 \pm 0,02$
V_{Akx} [mM min ⁻¹]	$1,998 \pm 0,005$
V_{Hyd} [mM min ⁻¹]	$0,649 \pm 0,001$
V_{Poly} [mM min ⁻¹]	$0,157 \pm 0,001$

5.3.2.3. Bestimmung der kinetischen Parameter der adsorbierten Fructosyltransferase in Alginatperlen

Die Ergebnisse der Modellierung der experimentellen Daten mit Bentonit-Alginat-Immobilisaten sind in den Abbildungen 5.24 bis 5.27 gezeigt.

Analog zur Optimierung der Parameter bei nativem bzw. adsorbiertem Enzym liefert das Reaktionsmodell eine gute Übereinstimmung ($R^2 = 0,91$; alle Daten: Anhang 10.2.3.3.).

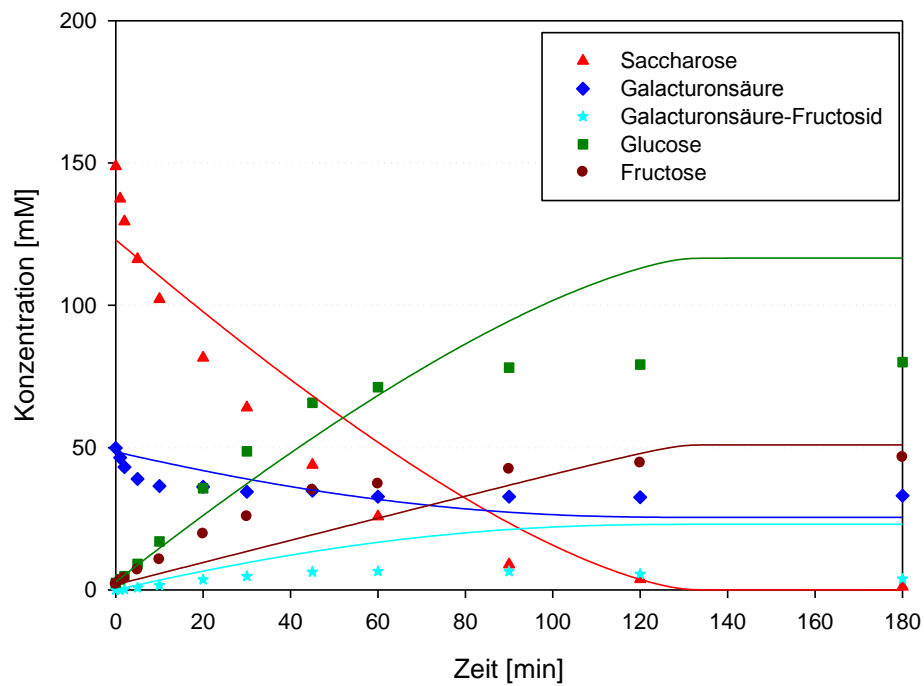


Abb. 5.24 Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit adsorbierter *SacB* in Alginatperlen (Produktbildung, Hydrolyse und Polymerbildung) mit Modell aus 5.3.1. ($c_{\text{Sac}} = 100 \text{ mM}$; $c_{\text{GalA}} = 50 \text{ mM}$; $5,0 \text{ U mL}^{-1}$; $T = 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$)

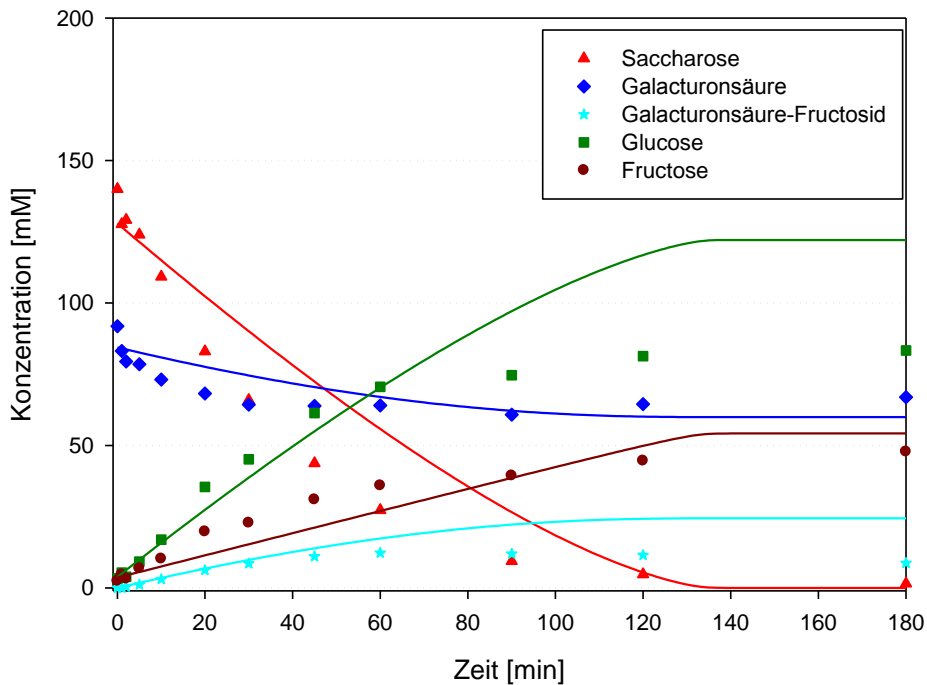


Abb. 5.25 Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit adsorbierter *SacB* in Alginatperlen (Produktbildung, Hydrolyse und Polymerbildung) mit Modell aus 5.3.1. ($c_{\text{Sac}} = 100 \text{ mM}$; $c_{\text{GalA}} = 100 \text{ mM}$; $5,0 \text{ U mL}^{-1}$; $T = 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$)

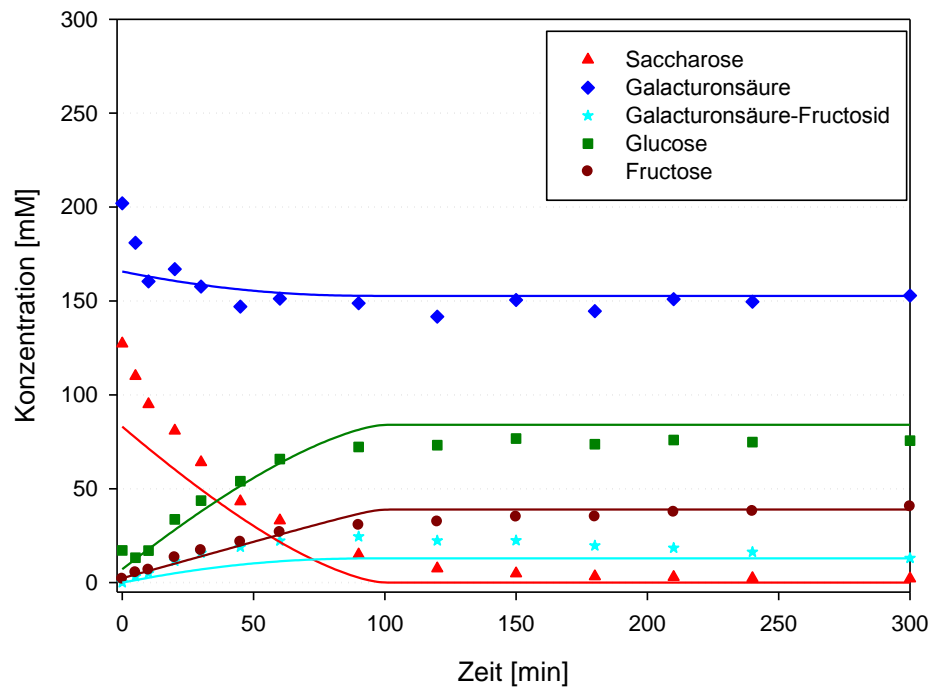


Abb. 5.26 Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit adsorbierter SacB in Alginateperlen (Produktbildung, Hydrolyse und Polymerbildung) mit Modell aus 5.3.1. ($c_{\text{Sac}} = 100 \text{ mM}$; $c_{\text{GalA}} = 250 \text{ mM}$; $5,0 \text{ U mL}^{-1}$; $T = 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$)

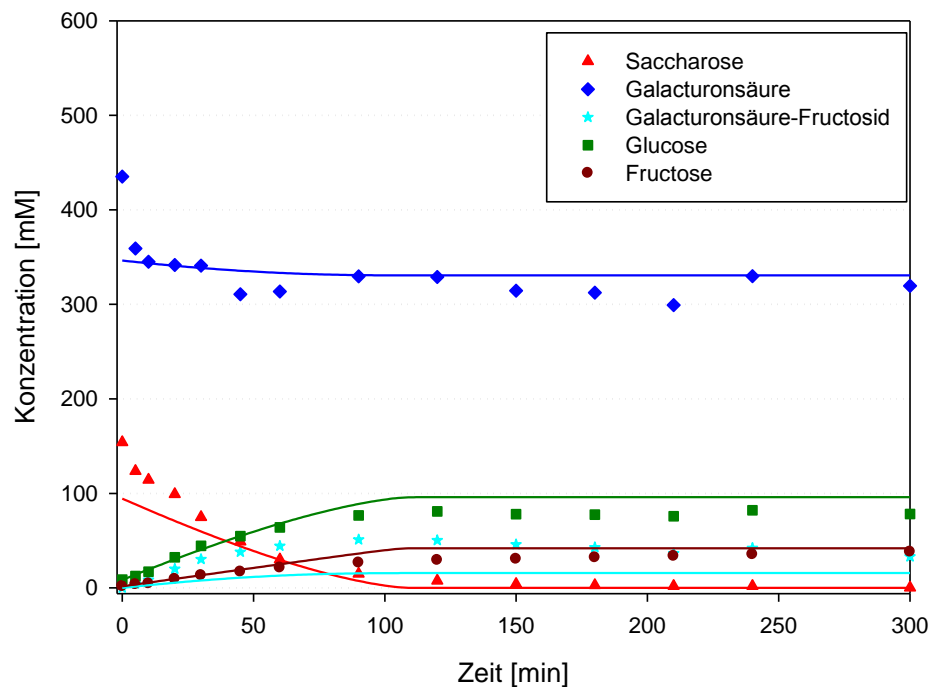


Abb. 5.27 Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit adsorbierter SacB in Alginateperlen (Produktbildung, Hydrolyse und Polymerbildung) mit Modell aus 5.3.1. ($c_{\text{Sac}} = 100 \text{ mM}$; $c_{\text{GalA}} = 500 \text{ mM}$; $5,0 \text{ U mL}^{-1}$; $T = 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$)

In Tabelle 5.5 sind die kinetischen Parameter der Bentonit-Alginat-Immobilisate der *SacB* zusammengefasst. Die adsorbierte *SacB* in Alginatperlen weist wie die adsorbierte eine verringerte maximale Hydrolyserate (63 % kleiner als im nativen Zustand) bzw. eine erhöhte maximale Produktbildungsrate (1,1mal größer als im nativen Zustand) gegenüber dem nativen Enzym auf.

Tab. 5.5 Kinetische Parameter der adsorbierten *SacB* in Alginatperlen; ermittelt durch Modellierungen mit dem in 5.3.1. erstelltem Reaktionsmodell; $R^2 = 0,913$

Parameter	Bentonit-Alginat <i>SacB</i>
$K_{M, Akx-Sac}$ [mM]	170 ± 9
$K_{M, Akx-GalA}$ [mM]	$0,95 \pm 0,05$
$K_{M, Hyd}$ [mM]	$0,56 \pm 0,03$
$K_{M, Poly}$ [mM]	21 ± 2
n [1]	$4,5 \pm 0,4$
V_{Akx} [mM min ⁻¹]	$0,85 \pm 0,03$
V_{Hyd} [mM min ⁻¹]	$0,39 \pm 0,01$
V_{Poly} [mM min ⁻¹]	$0,12 \pm 0,01$

5.3.2.4. Vergleich der kinetischen Parameter der nativen, adsorbierten und nach Adsorption in Alginat eingeschlossenen Fructosyltransferase

Tabelle 5.6 fasst die kinetischen Parameter der nativen, adsorbierten und Bentonit-Alginat *SacB* zusammen, die mit Hilfe des entwickelten Reaktionsmodells ermittelt wurden. Der Vergleich der kinetischen Parameter gibt Informationen über den Einfluss der Immobilisierung auf die Akzeptorreaktion mit der *SacB*.

Der Vergleich verdeutlicht, dass sowohl die an Bentonit adsorbierte als auch die nach der Adsorption eingeschlossene *SacB* eine geringere maximale Hydrolyserate gegenüber der nativen *SacB* (38 % bei den Bentonit-Immobilisaten; 63 % bei den Bentonit-Alginat-Immobilisaten) aufweisen. Des Weiteren steigt die maximale Geschwindigkeit der Akzeptorreaktion um die Faktoren 2,7 für die Bentonit- bzw. 1,1 für die Bentonit-Alginat-Immobilisate gegenüber der Reaktion mit nativer *SacB*. Der K_M des nativen Enzyms ($2,3 \pm 0,03$ mM) ist für den Akzeptor Galacturonsäure verglichen mit dem immobilisierten Enzym ($1,5 \pm 0,26$ mM für Bentonit- bzw. $0,9 \pm 0,05$ mM für Bentonit-Alginat-Immobilisaten) höher.

Daraus wird deutlich, dass die Immobilisierung der *SacB* dazu führt, dass die Produktbildung gegenüber der Hydrolyse bevorzugt wird, was insbesondere in Hinblick auf eine kontinuierliche Produktion des FOS Galacturonsäure-Fructosid von enormen Vorteil ist.

Die maximale Geschwindigkeit der Polymerbildung der nativen *SacB* ist gegenüber den immobilisierten Formen der *SacB* um die Faktoren 2,3 (Bentonit-Immobilisate) bzw. 1,7 (Bentonit-Alginat-Immobilisaten) niedriger. Der Grad der Polymerisation ist bei den Bentonit-Alginat-Immobilisaten mit 4,5 am größten.

Tab. 5.6 Vergleich der kinetischen Parameter der nativen, adsorbierten und Bentonit-Alginat *SacB*

Parameter	Native <i>SacB</i>	Adsorbierte <i>SacB</i>	Bentonit-Alginat <i>SacB</i>
$K_{M, Akx-Sac} [mM]$	111 ± 1	427 ± 2	170 ± 9
$K_{M, Akx-GalA} [mM]$	$2,28 \pm 0,03$	$1,5 \pm 0,3$	$0,95 \pm 0,05$
$K_{M, Hyd} [mM]$	$8,3 \pm 0,2$	$14,1 \pm 0,3$	$0,56 \pm 0,03$
$K_{M, Poly} [mM]$	49 ± 3	$2,4 \pm 0,3$	21 ± 2
$n [1]$	$2,75 \pm 0,07$	$1,63 \pm 0,02$	$4,5 \pm 0,4$
$V_{Akx} [mM \min^{-1}]$	$0,742 \pm 0,002$	$1,998 \pm 0,005$	$0,85 \pm 0,03$
$V_{Hyd} [mM \min^{-1}]$	$1,048 \pm 0,001$	$0,649 \pm 0,001$	$0,39 \pm 0,01$
$V_{Poly} [mM \min^{-1}]$	$0,067 \pm 0,002$	$0,157 \pm 0,001$	$0,12 \pm 0,01$

Chambert und Petit-Glatron (1993) zeigten für die Fructosyltransferase aus *Bacillus subtilis*, dass die Immobilisierung des Enzyms in einer Calcium-Phosphat-Matrix ebenfalls zu einer Erhöhung der Polymeraseaktivität führte. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit der Hydrolyse war bei dem immobilisierten Enzym um den Faktor zwei erniedrigt. Ursache hierfür kann die Mikroumgebung des immobilisierten Enzyms sein, in dem einerseits die Wasserverfügbarkeit und andererseits die Diffusion der wachsenden Polymerkette aus der Matrix begrenzt sind. Die daraus resultierende, lokal erhöhte Konzentration der Polymerketten kann der Grund für den Anstieg der Polymeraseaktivität darstellen, wodurch der Polymerisationsgrad der Kette steigt [Chambert und Petit-Glatron, 1989 & 1993].

Im Vergleich zur nativen *SacB* zeigte die in Alginat immobilisierte *SacB* ebenfalls eine größere maximale FOS-Bildungs- sowie Polymerbildungsgeschwindigkeit mit einem Polymerisationsgrad, der um den Faktor 1,6 höher ist als bei der nativen *SacB*.

Untersuchungen mit der nativen Levansucrase *SacB* aus *Bacillus subtilis* zur Synthese von Saccharose-Analoga und neuen FOS zeigten, dass abhängig vom Substrat verschiedene Polymerisationsgrade der Produkte erzielt werden (Substrat: Xyl-Fru: $n = 1-8$; Substrat: Gal-Fru: $n > 12$) [Beine et al., 2008].

Bei der Immobilisierung anderer Enzyme, wie z.B. der Co-Immobilisate von α -Amylase und Glucoamylase adsorbiert an Kieselgel bzw. DEAE-Cellulose mit anschließendem Einschluss in Alginat, wurde von einer Erniedrigung der K_M -Werte und damit einer höheren Affinität zum Substrat Stärke berichtet [Park et al., 2005].

Daraus wird deutlich, dass neben der Immobilisierung auch die Wahl des Substrates einen Einfluss auf die Polymeraseaktivität haben kann, der sowohl zu einer Erhöhung [Chambert und Petit-Glatron, 1989 & 1993] als auch einer Erniedrigung [Jang et al., 2001] der Polymeraseaktivität führen kann.

5.3.2.5. Abschätzung des zu erwartenden Katalysatornutzungsgrads

Die Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion wird nicht nur von der Aktivität des Biokatalysators sondern auch von der Limitierung des Stofftransports bestimmt.

Bei sehr kleinen Biokatalysatorpartikeln können innere Stofftransportlimitierungen, d.h. die Diffusion im Partikel, vernachlässigt werden. Bei größeren Partikeln muss hingegen mit einem Einfluss auf die beobachtete Reaktionsgeschwindigkeit gerechnet werden.

Aus Gleichung 2.13 (Kapitel 2.5.2.) und einem Perlendurchmesser von 0,19 cm ergibt sich ein Diffusionskoeffizient (für $c_{\text{Sac}} = 100 \text{ mM}$) von (Gleichung 5.12):

$$D_{\text{eff}} = 2,771 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ min}^{-1} \quad (4,619 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}) \quad (5.12)$$

Daraus ergibt sich für den Thiele-Modul (Gleichung 2.14, Kapitel 2.5.2.) ($d = 0,19 \text{ cm}$; $K_m = 2,28 \text{ mM}$; $V_{\text{max}} = 0,74 \text{ mM min}^{-1}$) (Gleichung 5.13):

$$\Phi = 3,4286 \quad (5.13)$$

und somit durch Einsetzen in Gleichung 2.15 (Kapitel 2.5.2.) ein Katalysatornutzungsgrad von 62 %. Das bedeutet, dass eine Diffusionshemmung von 38 % auftritt.

Für in Alginat immobilisierte Dextransucrase wurde von Berensmeier et al. (2004) für 100 mM Saccharose als Substrat ein Wirkungsgrad von 0,8 ermittelt. Des Weiteren wurde gezeigt, dass der Wirkungsgrad der immobilisierten Dextransucrase eine Abhängigkeit von der Substratkonzentration zeigt [Berensmeier et al., 2004]. Dieses Phänomen konnte für die *SacB* ebenfalls beobachtet werden (siehe Anhang 10.2.5.).

5.3.3. Kapitelzusammenfassung

Die Kinetik eines Enzyms (nativ, immobilisiert) ist für den industriellen Einsatz von großer Bedeutung, da sie der Optimierung der Reaktionsbedingungen und Auswahl eines geeigneten Reaktionssystems dient.

Für die kinetische Beschreibung der Akzeptorreaktion der Fructosyltransferase *SacB* zur Synthese des neuen FOS Galacturonsäure-Fructosid wurde ein Reaktionsmodell entwickelt, das die Bestimmung der kinetischen Parameter für das native, adsorbierte und nach Adsorption in Alginat eingeschlossene Enzym ermöglicht. Die kinetischen Konstanten wurden dabei durch Integration nach Runge-Kutta in Kombination mit dem Simplexalgorithmus zur Parameteroptimierung ermittelt (Programm: ModelMaker3[®]; Cherwell Scientific Publishing Ltd.).

Für die Bildung des Galacturonsäure-Fructosids wurde dabei vom „Ping-Pong-Mechanismus“ ausgegangen [André et al., 2003; Chambert et al., 1974; Homann, 2009; Seibel et al., 2006c], und erweitert um Terme für Hydrolyse und Polymerbildung entsprechend den realen Reaktionsverläufen.

Die Konzentrationsverläufe der Akzeptorreaktionen mit nativer, adsorbierter und nach Adsorption in Alginat eingeschlossener *SacB* konnten mit dem Reaktionsmodell gut beschrieben werden, obwohl aus genannten Gründen die Berücksichtigung der Hydrolyse des Galacturonsäure-Fructosids nicht erfolgen konnte. In weiterführenden Arbeiten sollte die Gewinnung des FOS in Gram-Maßstäben optimiert werden, um Untersuchungen hinsichtlich Produkthydrolyse und Produkttransfructosylierung zu höheren FOS durchführen und in die Ermittlung der kinetischen Parameter einbeziehen zu können.

Die mit dem Modell ermittelten kinetischen Parameter verdeutlichten, dass die Immobilisierung der *SacB*, sowohl durch Adsorption an Bentonit als auch anschließendem Einschluss in Alginat, einen Shift von Hydrolyse zur Produktbildung bewirkt. Die Hydrolyseraten der adsorbierten bzw. der Bentonit-Alginat *SacB* sind um 38 % bzw. 63 % geringer gegenüber der nativen *SacB*. Des Weiteren sind die maximalen Produktbildungsraten um die Faktoren 2,7 (Bentonit-Immobilisate) bzw. 1,1 (Bentonit-Alginat-Immobilisate) gegenüber der nativen *SacB* erhöht.

Des Weiteren konnte für die Bentonit-Alginat-Immobilisate der *SacB* ein Katalysator-nutzungsgrad von 62 % ermittelt werden.

5.4. Aufreinigung und Analyse der neuartigen Fructooligosaccharide

Das Downstream Processing stellt einen wichtigen Bereich der Biotechnologie dar. Zugleich ist es auch der kostenintensivste Faktor, da es bis zu 80 % der Herstellungskosten ausmacht [Farid, 2008; Gottschalk, 2006; Jagschies und O'Hara, 2007]. Daher sind die Wahl der jeweils geeigneten Methode sowie die Optimierung des Verfahrens wichtige Aspekte der aktuellen Forschung.

Das Ziel der Aufreinigung der FOS-Gemische ist es, das Produkt schnell und effizient in einer definierten reinen Form aus dem komplexen Reaktionsgemisch zu isolieren.

5.4.1. Untersuchungen zur reaktionsintegrierten Produktadsorption an Zeolithen

Analog zur Polymerisationstendenz der Dextranucrase weist auch die Fructosyltransferase ein hohes Potenzial zur Polymerisation auf.

Für eine reaktionsintegrierte Produktaufreinigung des Galacturonsäure-Fructosids wurden verschiedene Materialien (Träger auf Basis von Montmorillonit) sowie spezielle Zeolithe auf deren Eignung zur spezifischen Adsorption des Produktes untersucht.

Tabelle 5.7 fasst die Ergebnisse der Adsorptionsversuche mit verschiedenen Bentoniten zusammen. Die Tabelle verdeutlicht, dass das Galacturonsäure-Fructosid an keinen der untersuchten Adsorber adsorbiert wird.

Tab. 5.7 Übersicht der untersuchten Adsorber hinsichtlich ihrer Fähigkeit der Produktadsorption

Adsorber	Zucker in Produktlösung	Adsorption an Träger [%]		
		Produktgemisch [g L ⁻¹]		
		6,25	12,5	25,0
Calcigel (natürliches Ca-Bentonit; Firma: Südchemie) Verhältnis: 1:5	Glu	6	3	8
	Fru	23	4	12
	Sac	7	7	4
	GalA-Fru	0	0	0
	GalA	6	1	4
Opazil AO (Aktivbentonit mit hohem MB-Wert; Firma: Südchemie) Verhältnis: 1:5	Glu	23	5	8
	Fru	19	20	16
	Sac	21	2	9
	GalA-Fru	0	0	0
	GalA	0	0	0
Tixoton (Aktivbentonit; Firma: Südchemie) Verhältnis: 1:5	Glu	12	12	11
	Fru	40	24	24
	Sac	0	13	13
	GalA-Fru	0	0	0
	GalA	7	8	6

Adsorptionsversuche mit Nukleinsäuren an Montmorillonite zeigten, dass diese stark vom pH des Systems abhängig sind. Oberhalb von pH 5,0 ist die Adsorption minimal. Unterhalb dieses pH-Werts steigt sie zunehmend an. Dieses Adsorptionsverhalten wird darauf zurückgeführt, dass einige Aminogruppen der Purine und Pyrimidine protoniert werden, wenn der pH-Wert unterhalb des isoelektrischen Punktes der Nukleinsäuren (ca. pH 5) liegt. Daraus folgt die Zunahme der positiven Ladung des kernbildenden Ions, wodurch eine Erhöhung der Coulombschen Anziehung zwischen den positiv geladenen Gruppen des kernbildenden Ions und dem negativ geladenen Tonmineral resultiert [Greaves und Wilson, 1969; Jordan, 1955].

Der pK_a -Wert der Galacturonsäure liegt bei 3,42 [Doner et al., 1988]. Die Adsorptionsversuche zur Aufreinigung des Galacturonsäure-Fructosids wurden unter Reaktionsbedingungen, d.h. pH 6,6, durchgeführt. In Analogie zu den Adsorptionsergebnissen mit Nukleinsäuren [Greaves und Wilson, 1969], könnte das schlechte Adsorptionsverhalten des Galacturonsäure-Fructosids mit dem vergleichsweise „hohen“ pH-Wert des Reaktionsmediums begründet werden. Einen pH-Einfluss bei der Adsorption von Polysacchariden an Montmorillonite konnten ebenfalls bei Parfitt und Greenland (1970) festgestellt werden.

Hochspezifische Adsorptionsvorgänge von Oligosacchariden an verschiedenen dealuminierten Zeolithen konnten in vorangegangenen Arbeiten ermittelt werden [Buttersack et al., 1993, 1994 & 1997]. Verschiedene Zeolithe wiesen hohe Spezifität bei der Adsorption von Di- und Trisacchariden, wie z.B. Isomaltose, Isomaltulose, Leucrose und Stachyose, auf. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, mit Hilfe eines geeigneten Zeoliths das Zielprodukt mit hoher Selektivität aus dem Reaktionsgemisch zu isolieren.

Die Adsorptionsuntersuchungen an Zeolithen wurden bis auf eine Ausnahme (hydrophobiertes Naturzeolith) mit synthetischen Beta-Zeolithen (auch β -Zeolith) des Strukturtyps BEA durchgeführt. Dieses wurde erstmals 1967 synthetisiert [Weitkamp und Puppe, 1999], und dessen Strukturaufklärung gelang 1988 [Newsam et al., 1988].

Es wurden zwei verschiedene BEA Zeolithe eingesetzt: BEA25 ($\text{SiO}_2:\text{Al}_2\text{O}_3 = 25$; $\text{Si}:\text{Al} = 12,5:1$) und BEA 150 ($\text{SiO}_2:\text{Al}_2\text{O}_3 = 150$; $\text{Si}:\text{Al} = 75:1$). Beide Zeolithe gehören zu den dealuminierten Zeolithen ($\text{Si}:\text{Al} > 10$). Je höher das Verhältnis $\text{Si}:\text{Al}$ ist, desto hydrophober ist der Zeolith [Buttersack et al., 1995 & 1996 & 1997].

Beim Screenen nach einem geeigneten Zeolithen, der in der Lage ist, das Galacturonsäure-Fructosid spezifisch zu adsorbieren, wurden Einpunktmessungen durchgeführt. Diese

erlauben einen einfachen und schnellen Test hinsichtlich der Fragestellung, ob ein Adsorbens für ein Adsorptiv geeignet scheint oder nicht.

Bei den Untersuchungen wurden verschiedene Massenverhältnisse von Zeolith zu Galacturonsäure- bzw. Produktlösung eingestellt: 1:2 und 1:5. Tabelle 5.8 fasst die Ergebnisse der Untersuchungen zusammen.

Tabelle 5.8 zeigt, dass keiner der getesteten Zeolithe für eine reaktionsintegrierte Produktabtrennung geeignet ist. Eine Adsorption von Galacturonsäure-Fructosid findet entweder gar nicht oder nur im begrenztem Ausmaß statt. Bei dem Zeolith BEA25 (1:2, Produktlösung 20 g L⁻¹) werden zwar 17 % des Galacturonsäure-Fructosids adsorbiert, daneben aber auch 32 % Galacturonsäure sowie 38 % Fructose und 28 % Glucose. Für eine optimale Reaktionsführung ist es sehr nachteilig, wenn bereits 32 % des Akzeptors aus dem Reaktionsgemisch durch Adsorption an Zeolithen „entfernt“ werden. Des Weiteren bedeutet dies, dass das Produkt Galacturonsäure-Fructosid nach Desorption von dem Zeolith mit 85 % anderer Zucker (Glucose, Fructose, Galacturonsäure) verunreinigt ist.

Berensmeier und Buchholz (2004) führten Adsorptionsuntersuchungen mit verdünnten Kohlenhydratlösungen und BEA Zeolithen mit verschiedenen Si:Al-Verhältnissen (Si:Al = 12,5; 25; 75; 150) durch und ermittelten für die Adsorption von Isomaltose an BEA150 (Si:Al = 75) eine Exzessbeladung von 31 mg g⁻¹.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Berensmeier und Buchholz (2004), bei denen Saccharose bei allen untersuchten Zeolithen aus den Poren ausgeschlossen wurde, zeigte sich in dieser Arbeit eine Beladung der Zeolithe mit Saccharose. Bei Holtkamp (2011) zeigte sich für den Zeolithen BEA25 ebenfalls eine Beladung mit Saccharose, die gegenüber den Beladungen mit anderen Sacchariden (Glucose, Fructose, Isomaltose) sehr gering war.

Der Vergleich der Beladungen von Fructose und Glucose an die verschiedenen Zeolithe decken sich mit den Ergebnissen von Holtkamp (2011), der eine höhere Beladung für Fructose zeigte.

Im Gegensatz zu Ergebnissen der reaktionsintegrierten Abtrennung von Isomaltose [Berensmeier und Buchholz, 2004; Ergezinger, 2005; Ergezinger et al., 2005; Holtkamp, 2011; Jördening et al., 2005] konnte für das polare Galacturonsäure-Fructosid kein geeignetes Zeolith gefunden werden, das eine spezifische Adsorption des Produktes ermöglicht.

Tab. 5.8 Übersicht der untersuchten Zeolithe hinsichtlich ihrer Fähigkeit der Produktadsorption

Zeolith	Zucker in Produktlösung	Adsorption an Träger [%]					
		GalA-Lösung [g L ⁻¹]			Produktlösung [g L ⁻¹]		
		20	50	100	20	50	100
BEA25 Verhältnis: 1:5	Glu	/	/	/	17	20	13
	Fru				22	29	17
	Sac				5	13	3
	GalA-Fru				6	0	11
	GalA	23	22	20	12	0	17
BEA25 Verhältnis: 1:2	Glu	/	/	/	28	32	13
	Fru				38	44	17
	Sac				5	14	2
	GalA-Fru				17	3	0
	GalA	36	29	22	32	13	0
BEA25, behandelt, Kationenaustausch Verhältnis: 1:5	Glu	/	/	/	28	24	32
	Fru				34	33	40
	Sac				7	11	0
	GalA-Fru				8	0	0
	GalA	12	11	13	10	0	0
BEA25, behandelt, Kationenaustausch Verhältnis: 1:2	Glu	/	/	/	40	41	43
	Fru				49	50	55
	Sac				6	11	7
	GalA-Fru				2	0	0
	GalA	12	46	16	7	0	0
BEA150 Verhältnis: 1:5	Glu	/	/	/	19	28	19
	Fru				20	36	23
	Sac				0	21	16
	GalA-Fru				0	13	7
	GalA	21	19	17	12	10	8
BEA150 Verhältnis: 1:2	Glu	/	/	/	18	29	25
	Fru				21	34	25
	Sac				0	10	6
	GalA-Fru				0	0	0
	GalA	24	24	24	12	6	0
BEA150, konditioniert mit NaCl Verhältnis: 1:5	Glu	/	/	/	28	30	16
	Fru				24	34	15
	Sac				3	20	14
	GalA-Fru				0	0	0
	GalA	25	22	21	8	4	0
BEA150, konditioniert mit NaCl Verhältnis: 1:2	Glu	/	/	/	34	44	33
	Fru				43	47	31
	Sac				2	14	9
	GalA-Fru				0	0	0
	GalA	15	16	16	3	0	0
Hydrophobiertes Naturzeolith (Hydrophobierungsmittel: Siloxan; Firma: Ostwesttransfer) Verhältnis: 1:5	Glu	/	/	/	/	20	/
	Fru					20	
	Sac					19	
	GalA-Fru					15	
	GalA	0				17	
Hydrophobiertes Naturzeolith (Hydrophobierungsmittel: Siloxan; Firma: Ostwesttransfer) Verhältnis: 1:2	Glu	/	/	/	/	20	/
	Fru					21	
	Sac					19	
	GalA-Fru					15	
	GalA	0				17	

5.4.2. Chromatographische Aufreinigung der neuen Fructooligosaccharide

Im Allgemeinen werden chromatographische Verfahren zur Entfernung von einfachen Zuckern, wie z.B. Glucose, Fructose und Saccharose, aus Oligosaccharidgemischen verwendet. Shimizu und Li (2005) stellten für die Isolierung von Mono- und Oligosacchariden folgende Trennmaterialien zusammen: Sephadex G10 & G15, Polymergele (z.B. Bio-Gel® P2), Ca-funktionalisierte Gele (z.B. Supercogel Ca), starke Kationenaustauscher ($-\text{SO}_3\text{H}$) oder schwache Anionenaustauscher.

Zur präparativen Aufreinigung stellt die Säulenchromatographie eine weit verbreitete Methode in der Biotechnologie dar. Die Trennstrecke ist eine mit einer stationären Phase gefüllte Säule, durch die das Probengemisch von der mobilen Phase gespült und dabei in einzelne Bestandteile getrennt wird. Die Probennahme erfolgt durch Fraktionieren nach verschiedenen Zeitintervallen. Die einzelnen Substanzen werden nach dem Verlassen der Säule mittels HPLC bzw. HPAEC detektiert (Kapitel 4.8.2.2.).

Die Untersuchungen zur reaktionsintegrierten Produktabtrennung mit Zeolithen lieferten keinen positiven Treffer bei dem Screening verschiedener Materialien. Es konnte kein geeigneter Zeolith gefunden werden, der in der Lage ist, das Produkt spezifisch zu adsorbieren. Daher wurde die Aufreinigung des Galacturonsäure-Fructosids aus dem Produktionsgemisch mittels nachgeschalteter Säulenchromatographie untersucht. Es wurden verschiedene Austauschmaterialien hinsichtlich ihrer Eignung zur Abtrennung des Galacturonsäure-Fructosids aus der Produktlösung getestet. Der Reaktionsansatz der Akzeptorreaktion mit Galacturonsäure wurde aufkonzentriert, so dass Produktlösungen mit einer Gesamtzuckerkonzentration von 300 bis 600 g L⁻¹ vorlagen.

Als Trennprinzipien wurden die Gel-Permeations-Chromatographie (auch Gelfiltration) und die Ionenaustauschchromatographie genutzt.

5.4.2.1. Biogel

In der Gelfiltration verlassen die gelösten Substanzen das Gelbett in der Reihenfolge abnehmenden Molekulargewichts. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Biogel Bio-Gel® P2 der Firma Bio-Rad handelt es sich um ein Polyacrylamidgel. Es wird durch Copolymerisation von Acrylamid und N, N'-Methylen-bis-acrylamid hergestellt. Die Bio-Gele vom P-Typ sind

mit verschiedenen Eigenschaften erhältlich, die sich hinsichtlich ihres Quellvermögens und ihrer Ausschlussgrenzen unterscheiden. Das gequollene Bio-Gel® P2 hat eine Partikelgröße von 45 – 90 µm und eine Ausschlussgrenze zwischen 0,1 – 1,8 kDa. Die Gelfiltration über Polyacrylamidgele (Bio-Gel® P2, etc.) mit Wasser als Eluenten ist eine leistungsfähige Methode zur Trennung von Oligosacchariden [Bio-Rad; Guire, 1971; Lloyd et al., 1966; Pontis, 1968; Trénel et al., 1968].

Die Untersuchungen zur Aufreinigung des Galacturonsäure-Fructosids aus dem Produktgemisch wurden mit zwei Glassäulen durchgeführt (siehe Kapitel 4.8.2.3.).

Bei der Trennung mit Biogel eluieren große Moleküle schneller als kleine Moleküle. Daher sind die in der Produktlösung enthaltenen Zucker in der folgenden Reihenfolge zu erwarten: Galacturonsäure-Fructosid ($M = 356 \text{ g mol}^{-1}$), Saccharose ($M = 342 \text{ g mol}^{-1}$), Galacturonsäure ($M = 194 \text{ g mol}^{-1}$), Glucose und Fructose (je $M = 180 \text{ g mol}^{-1}$).

Die Trennung über die kleinere Biogelsäule (L: 46 cm, ø 4 cm; Retentionszeit: 1 h 38 min) ergab sich als nicht optimal. Der größte Anteil des Galacturonsäure-Fructosids koeluierte zusammen mit der Galacturonsäure. Die beiden Komponenten besitzen zwar eine ausreichende Größendifferenz (356 zu 194 g mol^{-1}), um voneinander getrennt zu werden, jedoch sind beide Zucker aufgrund ihrer Carboxylgruppe sehr polar. Die fast zeitgleiche Elution der beiden Zuckersäuren ist wahrscheinlich auf Wechselwirkungen miteinander und mit dem Gel zurückzuführen [Heftmann, 1985; Laurent und Fraser, 1992; Raftery et al., 1969].

Die Trennung von Oligosacchariden der Hyaluronsäure über Gelfiltration (Bio-Gel® P2) lieferten unter der Verwendung von Wasser als Eluenten schlechte Trennergebnisse. Eine Verbesserung der Trennung konnte durch den Austausch des Eluenten zu 25 %iger Essigsäure erzielt werden [Raftery et al., 1969]. Vergleichbare Fraktionierungen konnten bei der Trennung von Hyaluronsäure-Oligosaccharidgemischen bei Dahlquist et al. (1968) sowie Flodin und Aspberg (1961) gezeigt werden.

Die Trennung von Oligosacchariden, die Säuregruppen tragen, über Gelfiltration (meistens über Bio-Gel® P2 oder Sephadex G25) wird durch Eluenten, die Elektrolyte enthalten, verbessert. Die erforderlichen Elektrolytkonzentrationen richten sich dabei nach der Ionenstärke, die zur Eliminierung der Interaktionen des jeweiligen speziellen Falls benötigt werden. Übliche Eluenten sind z.B. 0,1 M NaCl, 1 M NaCl, 0,1 M NaAc oder 0,01 M Essigsäure [Dietrich, 1968; Flodin et al., 1964; Raftery et al., 1969].

Daher wurde im Folgendem die Trennung zwischen Galacturonsäure und Galacturonsäure-Fructosid über das Polyacrylamidgel (Bio-Gel® P2; Säule: L: 100 cm, \varnothing 3 cm) durch Elution mit 0,1 M NaAc untersucht. Abbildung 5.28 zeigt das Chromatogramm der Trennung. Daraus ergibt sich, dass die beiden Zuckersäuren wieder als erstes von dem Säulenmaterial eluieren. Jedoch konnte im Gegensatz zu der Trennung mit Wasser das Galacturonsäure-Fructosid mit einer Reinheit von 98 % und einer Ausbeute von 8 % gewonnen werden.

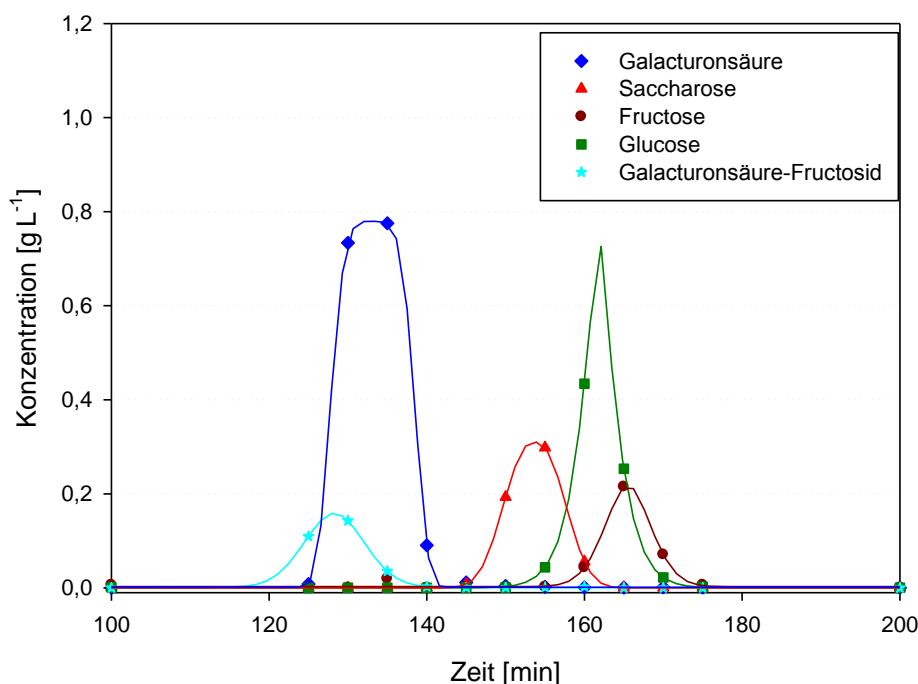


Abb. 5.28 Chromatogramm der Auftrennung des Produktgemisches mit Biogel® P2 (Eluent: 0,1 M NaAc, pH 5,6; Säule: L: 100 cm, \varnothing 3 cm)

5.4.2.2. Anionenaustauscher

Neben den Untersuchungen mit der Biogelsäule wurden auch Experimente mit Anionenaustauschern durchgeführt. Dafür wurden Vorversuche auf DC's durchgeführt, deren stationäre Phase eine Mischung aus Kieselgel und einem stark basischen Anionenaustauscher auf Polyesterfolien ist (IONEX-25 SB-AC, der Firma Macherey-Nagel). Bei diesen Versuchen konnte die Galacturonsäure und das Galacturonsäure-Fructosid mit 100 mM NaOH als Laufmittel voneinander getrennt werden.

Daher wurden zunächst in einer sehr kleinen Chromatographiesäule (Tabelle 4.15, Kapitel 4.8.2.3.) Untersuchungen mit dem stark basischen Ionenaustauscher Dowex MSA-2

durchgeführt. Die Matrix dieses Ionenaustauschers besteht aus einem Copolymer aus Styrol und Divinylbenzol (DVB) mit Dimethylaminoethanol (DMAE) als funktionelle Gruppe.

Die Abtrennung der Mono- (Glucose, Fructose) und Disaccharide (Saccharose) aus dem Produktgemisch konnte über den starken Anionenaustauscher realisiert werden. Sie wurden als erstes vom Säulenmaterial eluiert. Allerdings konnte keine Elution des Akzeptors Galacturonsäure sowie des Produktes Galacturonsäure-Fructosid detektiert werden. Der Akzeptor und das Produkt wurden sehr stark an das Anionenaustauschmaterial gebunden. Diese Bindung konnte nicht ohne weiteres wieder gelöst werden. Eine Abtrennung mit 0,1 M NaOH konnte nicht erreicht werden. Daher wurde 5 %ige NaOH-Lösung verwendet, um die Galacturonsäure bzw. das Galacturonsäure-Fructosid wieder von dem Säulenmaterial zu trennen, jedoch konnte selbst unter diesen Bedingungen keine Abtrennung erzielt werden. Im Gegenteil der Einsatz der hohen NaOH-Konzentrationen führte zur Zerstörung des Säulenmaterials.

Mit Dowex Monosphere 66 (Tabelle 4.14, Kapitel 4.8.2.3.) wurde ein weiterer basischer Ionenaustauscher untersucht. Dabei handelt es sich, im Gegensatz zum Dowex MSA-2, um ein schwach basisches Austauschmaterial, dessen Matrix ebenfalls auf Styrol-DVB-Basis besteht. Allerdings ist dessen funktionelle Gruppe ein tertiäres anstelle eines quartären Amins.

Aus Vorversuchen mit dem schwachen Anionenaustauscher wurde eine optimale Betriebstemperatur von 60 °C ermittelt. Dies stellt gleichzeitig die maximale Arbeitstemperatur des Ionenaustauschers dar.

Zur Abtrennung des Produktes aus dem Produktgemisch wurden verschiedene Ansätze zur Elution gewählt. Die Versuche mit deionisiertem Wasser, 0,1 M HCl und 0,1 M NaOH führten zu keiner Trennung zwischen Galacturonsäure und Galacturonsäure-Fructosid. Erst mit 1 M NaOH als Eluenten konnte eine Trennung dieser beiden Komponenten erreicht werden. Eine weitere Optimierung konnte durch die sequentielle Elution mit deionisiertem Wasser, gefolgt von 1 M NaOH erzielt werden. Es konnte das Galacturonsäure-Fructosid mit einer Reinheit von 100 % gewonnen werden. Dabei betrug die Ausbeute jedoch lediglich 0,7 %. Ursache für die geringe Ausbeute könnte sein, dass das Produkt (sowie die Galacturonsäure) nicht vollständig von dem Austauschmaterial eluiert wurden.

Des Weiteren ist die Elution mit 1 M NaOH nachteilig, da für weitere Untersuchungen zunächst das eluierte Produkt mit HCl neutralisiert werden musste, wodurch sich ein weiterer Aufreinigungsschritt ergibt, um das entstandene Salz zu entfernen. Die Entsalzung des Produktes konnte über den Mischbett-Ionenaustauscher Dowex Monosphere 450 erfolgreich durchgeführt werden. Dennoch verdeutlicht es, dass eine großtechnische Aufreinigung mit diesem Ionenaustauscher und 1 M NaOH als Eluenten nicht sinnvoll ist.

5.4.2.3. Kationenaustauscher

Zur Aufreinigung von Mono- und Oligosacchariden nennen Shimizu und Li (2005) neben Materialien zur Gelfiltration und Anionenaustauschharzen auch die Möglichkeit der Isolierung über starke Kationenaustauscher.

Die Isolierung des Galacturonsäure-Fructosids aus der Produktlösung wurde mit dem Ionenaustauscher Purolite PCR 642 Ca^+ -Form untersucht. Dieser findet industriell großtechnische Anwendung zur Separation von Glucose-Fructose-Gemischen und Entfernung von Restzuckern aus Melasse [Purolite®]. Purolite PCR 642 ist ein starker Kationenaustauscher auf der Basis von Styrol-DVB mit einem Vernetzungsgrad von 6 %, Sulfonsäure als funktionelle Gruppe und Calcium als Kation (durchschnittliche Partikelgröße: 295 – 335 μm). In dieser Arbeit wurde das Purolite-Harz durch Regeneration mit 3 M NaCl in die Natriumform überführt.

Baciu (2004) und Seibel et al. (2005) setzten das Purolite-Harz PCR 6 zur Trennung der Saccharose-Analoga ein. Dieser ist dem oben genannten PCR 642 äquivalent.

Die Trennungen mit deionisiertem Wasser als mobile Phase wurden in einer Chromatographiesäule mit 1 m Länge und einem Durchmesser von 3 cm sowie zusätzlich in einer 2 m langen, beheizbaren Glassäule mit dem Durchmesser von 15 cm durchgeführt. Die Versuche mit 0,1 mM und 0,01 mM NaOH als mobile Phase wurden nur in der 1 m langen Chromatographiesäule durchgeführt. Die genauen Parameter der jeweiligen Säulen sind in Tabelle 4.16 (Kapitel 4.8.2.3.) nachzuschlagen.

Abbildung 5.29 zeigt das Trennergebnis der Produktlösung mit dem Purolite-Harz und deionisiertem Wasser als Eluenten. Die Abtrennung der Mono- (Glucose, Fructose) und der Disaccharide (Saccharose) von dem Galacturonsäure-Fructosid ist erfolgreich. Jedoch ist

keine Separation zwischen Galacturonsäure und Galacturonsäure-Fructosid möglich. Das Galacturonsäure-Fructosid kann in einer maximalen Reinheit von 20 % mit einer geringen Ausbeute von 0,9 % gewonnen werden.

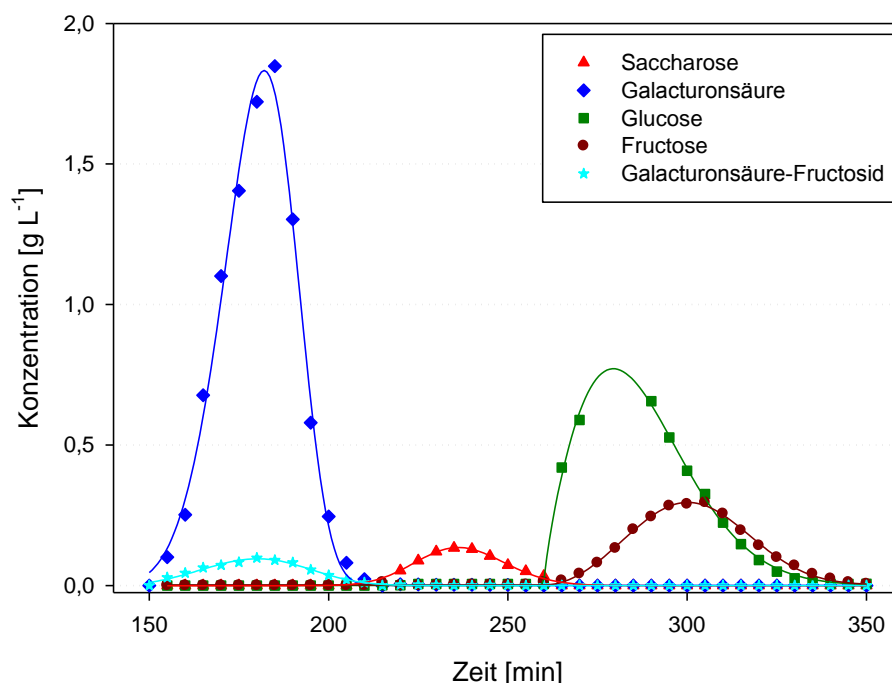


Abb. 5.29 Chromatogramm der Auftrennung des Produktgemisches mit Purolite PCR 642 Ca⁺-Form (Eluent: deion. Wasser; Säule: L: 2000 cm, ø 15 cm)

Die Elution mit 0,01 mM NaOH führt sowohl zur Erhöhung der Reinheit (72 %) als auch zur Steigerung der Ausbeute (14 %) an Galacturonsäure-Fructosid. Durch eine weitere Erhöhung der Elektrolytkonzentration des Eluenten konnte mit 0,1 mM NaOH als mobile Phase das Produkt mit einer Reinheit von 85 % und einer Ausbeute von 6,6 % erhalten werden.

In Tabelle 5.9 sind die Ergebnisse der Auftrennung über das Purolite-Harz mit verschiedenen Eluenten zusammengefasst. Daraus wird ersichtlich, dass die Reinheit der Galacturonsäure-Fructosid-Fraktion mit zunehmendem pH-Wert steigt.

Tab. 5.9 Vergleich der Trennresultate mit Purolite PCR 642 Ca⁺ mit verschiedenen Eluenten

Eluent	pH-Wert	Reinheit _{GalA-Fru} [%]	Ausbeute _{GalA-Fru} [%]
deion. Wasser	7,0	20	0,9
0,01 mM NaOH	9,1	72	14
0,1 mM NaOH	9,9	85	6,6

Negativ geladene Moleküle, wie die Galacturonsäure und das Galacturonsäure-Fructosid, werden vom Austauschharz aufgrund der elektrostatischen Kräfte ausgeschlossen und eluieren als Erstes ohne jegliche Rückhaltung [Peacock, 1996].

Das erklärt, warum die Galacturonsäure gleich zu Beginn mit dem Galacturonsäure-Fructosid eluiert. Die Addition von Elektrolyten in der mobilen Phase erniedrigt die elektrostatischen Wechselwirkungen untereinander bzw. mit dem Austauschharz, so dass die Trennung zwischen den beiden polaren Komponenten Galacturonsäure und Galacturonsäure-Fructosid verbessert werden kann.

Bei Baciú (2004) erfolgt die Abtrennung der Galacturonsäure aus einem Reaktionsgemisch über den Ionenaustauscher Finex CS13 GC Na⁺-Form (FinexTM, Finnland). Dabei handelte es sich um einen stark sauren Kationenaustauscher, bei dem die Matrix aus Styrol vernetzt mit DVB und Sulfonsäure als funktionelle Gruppe besteht. Dieser Ionenaustauscher wird nicht mehr vertrieben. Jedoch ist das Austauschharz Amberlite CG-120 Na⁺-Form dem Kationenaustauscher von FinexTM äquivalent. Als mobile Phase wurde eine Pufferlösung pH 4 eingesetzt.

Abbildung 5.30 stellt die chromatographische Auftrennung des Produktgemisches mit dem Amberlite-Harz dar.

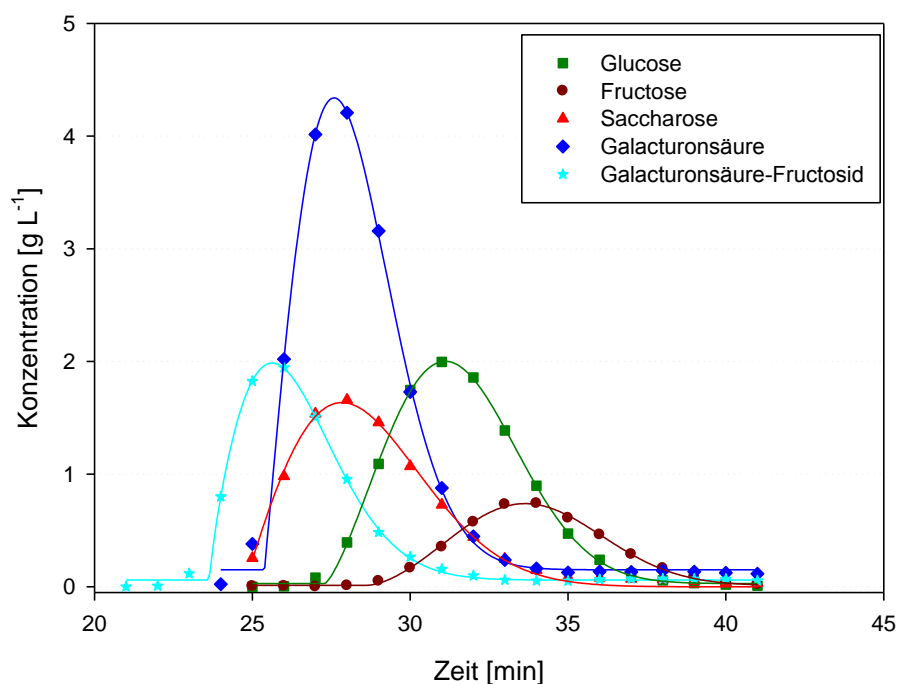


Abb. 5.30 Chromatogramm der Auftrennung des Produktgemisches mit Amberlite CG-120 Na⁺-Form (Eluent: Pufferlösung, pH 4,0; Säule: L: 100 cm, ø 3 cm)

Die Auftrennung über das Amberlite-Harz lieferte gereinigtes Produkt. Das Galacturonsäure-Fructosid konnte mit einer Reinheit von 100 % gewonnen werden. Jedoch betrug die Ausbeute dabei lediglich 3,6 %. Der Aufreinigungsfaktor lag dabei bei 6,9. Es konnten auch Fraktionen mit einer Reinheit von 96 % bei einer Ausbeute von 6,1 % gewonnen werden.

Für den großtechnischen Maßstab ist das Amberlite-Harz im Gegensatz zum Purolite-Harz aus wirtschaftlicher Sicht ungeeignet. Da sich die beiden Kationenaustauschharze lediglich hinsichtlich ihrer Ionenform (Amberlite: Na^+ -Form; Purolite: Ca^{2+} -Form) und ihrer Partikelgröße (Amberlite: 100 - 200 μm ; Purolite: 295 - 335 μm) unterscheiden, nicht aber in ihrer Matrix (Styrol vernetzt mit DVB) und funktionellen Gruppe (Sulfonsäure), ist es denkbar, dass die Trenneigenschaften des Purolite-Harzes bei sauren pH-Werten vergleichbar mit denen des Amberlite-Harzes sind. Daher wurde das Purolite-Harz mit einer Pufferlösung pH 4 als mobile Phase hinsichtlich der Eignung zur Trennung von Galacturonsäure und Galacturonsäure-Fructosid untersucht.

Abbildung 5.31 zeigt das Trennergebnis mit dem Purolite-Harz bei Elution mit der Pufferlösung pH 4.

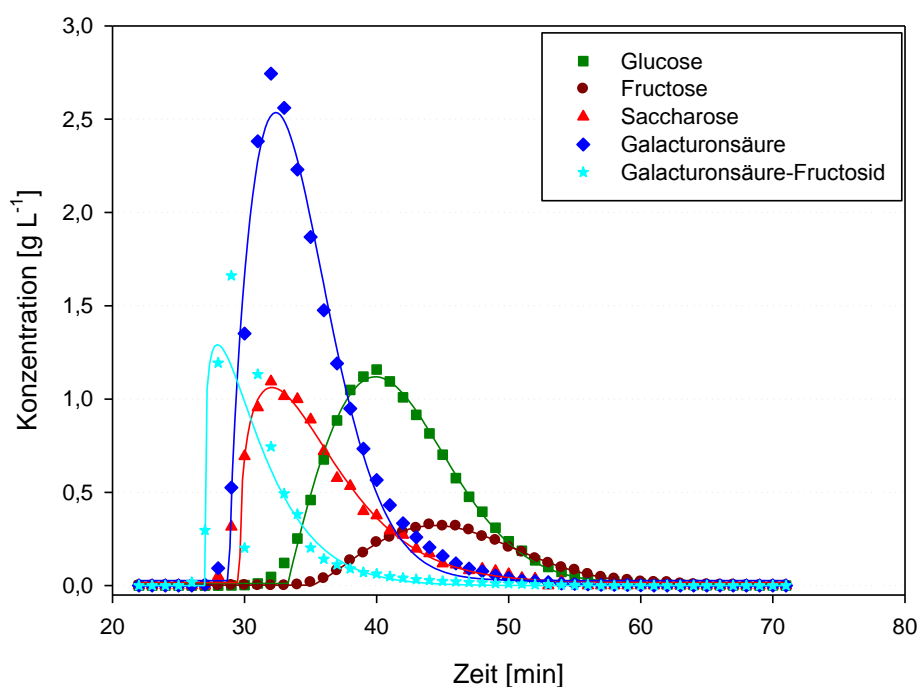


Abb. 5.31 Chromatogramm der Auftrennung des Produktgemisches mit Purolite PCR 642 Ca^{2+} -Form (Eluent: Pufferlösung, pH 4,0; Säule: L: 100 cm, \varnothing 3 cm)

Der Vergleich der Ausbeuten bei einer Reinheit > 99 % zeigt, dass die Ausbeute mit dem Amberlite-Harz um den Faktor 14 größer ist. Bei geringeren Reinheiten (< 85 %) liefern beide Austauschharze vergleichbare Ausbeuten (siehe Tabelle 5.10). Damit wird deutlich, dass für die großtechnische Aufreinigung das Purolite-Harz unter der Verwendung eines sauren Eluenten geeigneter ist als das Amberlite-Harz, da letzteres viel teurer ist.

5.4.2.4. Vergleich der Austauschmaterialien

Die Kapitel 5.4.2.1. bis 5.4.2.3. stellten die Ergebnisse der verschiedenen Trennmaterialien bezüglich deren Trennpotential von Galacturonsäure-Fructosid aus der FOS-Produktlösung dar.

In Tabelle 5.10 sind diese Ergebnisse zusammengefasst, um die verschiedenen Trennmaterialien gegenüber zu stellen.

Der Vergleich der verschiedenen Chromatographiematerialien zeigt, dass das Galacturonsäure-Fructosid in 100 %iger Reinheit mit dem Anionenaustauscher Dowex Monosphere 66 (Eluent: deion. Wasser + 1 M NaOH) und den beiden Kationenaustauschern Purolite PCR 642 Ca⁺ bzw. Amberlite CG-120 Na⁺ (Eluent: jeweils Pufferlösung, pH 4,0) gewonnen werden kann. Jedoch gibt es gravierende Unterschiede in den Ausbeuten. Mit dem Amberlite-Harz kann im Vergleich zu den beiden anderen Austauschharzen eine 14mal (Purolite) bzw. fünfmal (Dowex Monosphere 66) so hohe Ausbeute an reinem Produkt gewonnen werden. Des Weiteren hat die Aufreinigung des Produktes über den Anionenaustauscher den Nachteil, dass das gewonnene Produkt neutralisiert werden muss, und dabei ein Salz entsteht, das wiederum weitere Aufreinigungsschritte erforderlich macht.

Jedoch ist der Einsatz des Amberlite-Harzes aufgrund der hohen Materialkosten für eine Aufreinigung im größeren Maße aus wirtschaftlichen Gründen ungeeignet. Eine Alternative bietet das Purolite-Harz, das bereits industriell zur Aufreinigung von Melassen verwendet wird, und kostengünstig ist. Des Weiteren zeigt der Vergleich der beiden Kationenaustauschharze, dass sich die Ausbeuten an Galacturonsäure-Fructosid geringerer Reinheit (< 85 %) für beide Austauschharze kaum noch unterscheiden.

Tab. 5.10 Vergleich der unterschiedlichen Austauschmaterialien hinsichtlich deren Potential zur Aufreinigung des GalA-Fru

Austauschmaterial	Eluent	Reinheit _{GalA-Fru} [%]	Ausbeute _{GalA-Fru} [%]
Bio-Gel® P2	0,1 M NaAc (L: 100 cm, ø 3 cm)	98	8,4
		55	33
Dowex MSA-2	+ anschließend 5 %ige NaOH	Elution nicht möglich	0
Dowex Monosphere 66	deion. Wasser + 1 M NaOH	100	0,7
Purolite PCR 642 Ca ⁺ -Form	deion. Wasser	20	0,9
	0,01 mM NaOH, pH 9,1	79	14
	0,1 mM NaOH, pH 9,9	85	6,6
	Pufferlösung, pH 4,0	100	0,25
		84	31
		75	44
		70	46
Amberlite CG-120 Na ⁺ -Form	Pufferlösung, pH 4,0	61	52
		100	3,6
		96	6,1
		90	23
		86	30
		80	36
		71	43
		61	50

Die präparative Gewinnung des Galacturonsäure-Fructosids liefert Fraktionen mit einer Reinheit von 84 %, 75 % bzw. 70 % bei einer Ausbeute von 31 %, 44% bzw. 46 %.

Aufgrund der positiven Eigenschaften der Galacturonsäure, wie z.B. Calciumadsorption, wirkt sich ein 16-30 %iger Anteil im Produkt vermutlich nicht nachteilig aus.

Abbildung 5.32 zeigt die Chromatographiesäule (L: 2000 bzw. 3000 cm, ø 15 cm), die zur Aufreinigung im größeren Maßstab verwendet werden kann.



Abb. 5.32 Chromatographiesäule zur Aufreinigung im größerem Maßstab (Säule: L: 2000 cm – erweiterbar auf 3000 cm, \varnothing 15 cm; Stationäre Phase: Purolite PCR 642 Ca⁺-Form)

5.4.3. Untersuchungen zur mikrobiellen Aufreinigung mittels *Zymomonas mobilis*

Die Untersuchungen zur integrierten Produktabtrennung mit Zeolithen haben gezeigt, dass diese derzeit nicht besonders erfolgsversprechend für die Adsorption des Galacturonsäure-Fructosids scheint. Es konnte kein geeignetes Zeolith gefunden werden, das in der Lage ist, das Produkt spezifisch zu adsorbieren. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass auch die chromatographische Aufreinigung des Galacturonsäure-Fructosids nur bedingt erfolgreich ist. Eine Aufreinigung des Produktes mit 100 %iger Reinheit konnte zwar erreicht werden, jedoch in einer sehr geringen Ausbeute von lediglich 3,6 %. Daher wurde im Folgenden eine mikrobielle Aufreinigung der Produktlösung untersucht.

Das gram-negative Bakterium *Zymomonas mobilis* nutzt lediglich Saccharose, D-Glucose und D-Fructose als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle [Swings und DeLey, 1977; Viikari, 1988]. Es besitzt keine Carbohydrasen, die in der Lage sind, die meisten Oligosaccharide zu hydrolisieren. *Zymomonas mobilis* fermentiert sehr schnell Glucose und Fructose zu Ethanol und Kohlenstoffdioxid unter nur geringer Nebenproduktbildung. Die

Fermentation von Saccharose führt zu kleinen Mengen an Sorbitol [Doelle et al., 1993; Viikari, 1988].

In der Studie von Crittenden und Playne (2002) wurden immobilisierte Zellen von *Zymomonas mobilis* eingesetzt, um Glucose, Fructose und Saccharose aus Inulin-, Fructo-, Malto-, Isomalto- und Gentio-Oligosaccharidgemischen zu entfernen. Innerhalb von 12 h konnte ein vollständiger Abbau von Glucose, Fructose und Saccharose beobachtet werden, wobei keine Fermentation der Oligosaccharide stattfand.

Die Produktlösung enthält neben dem Galacturonsäure-Fructosid noch Glucose, Fructose, Saccharose und Galacturonsäure. Um die ersten drei genannten Zucker aus dem Gemisch zu entfernen, wurden entsprechend der Studie von Crittenden und Playne (2002) Untersuchungen zur mikrobiellen Aufreinigung der Oligosaccharidgemische mit *Zymomonas mobilis* ATCC 39676 durchgeführt. Die Versuche erfolgten in Batch-Ansätzen mit freien *Zymomonas mobilis*-Zellen. Dafür wurden diese zunächst in einem Wachstumsmedium herangezüchtet. Es standen zwei Medien zur Auswahl: das ATCC 1731-Medium (Anzuchtmedium von der ATCC) und eine abgewandelte Form dieses Mediums entsprechend Crittenden und Playne (2002) (Kapitel 4.3.2. und 4.3.3.). Diese beiden Medien unterscheiden sich lediglich hinsichtlich ihrer Kohlenstoffquelle (ATCC 1731: 150 g L⁻¹ Saccharose; ATCC 1731_{abgewandelt}: 100 g L⁻¹ Glucose) und ihres pH-Wertes (ATCC 1731: 7,0; ATCC 1731_{abgewandelt}: 6,5), alle anderen Komponenten der Medien sind identisch.

Die Anzucht des Bakteriums lieferte unter Verwendung des ATCC 1731-Mediums nach 48 h eine Biotrockenmasse von 5,2 g L⁻¹. Die Kultivierung in dem abgewandelten Medium nach Crittenden und Playne (2002) führte zu einer Steigerung der Biotrockenmasse um 43 % auf 9,1 g L⁻¹. Daher wurden alle weiteren Kultivierungen von *Zymomonas mobilis* mit dem Medium nach Crittenden und Playne (2002) durchgeführt.

Die Untersuchungen zur mikrobiellen Aufreinigung wurden mit einer aufkonzentrierten Produktlösung (350 g L⁻¹) der Galacturonsäure-Fructosid-Produktion durchgeführt.

Abbildung 5.25 stellt die Konzentrationsverläufe der einzelnen Zucker aus der Produktlösung während der Fermentation mit *Zymomonas mobilis* dar. Daraus wird ersichtlich, dass Fructose, Glucose und Saccharose aus der Reaktionslösung durch mikrobiellen Abbau entfernt werden können. Allerdings verdeutlicht Abbildung 5.33 auch, dass das Produkt Galacturonsäure-Fructosid teilweise verstoffwechselt wurde. Tabelle 5.11 fasst die Abbaugrade der einzelnen in der Reaktionslösung befindlichen Zucker zusammen.

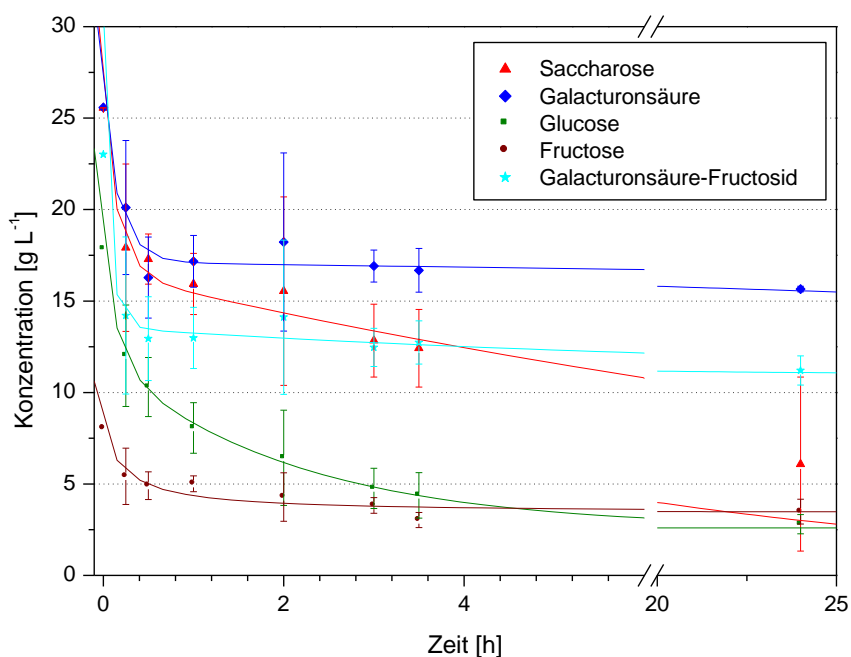


Abb. 5.33 Fermentation des GalA-Fru-Produktgemisches mit *Zymomonas mobilis* ATCC 39676

Nach 24 h konnte Glucose zu $84 (\pm 2,9) \%$ abgebaut werden. Der Abbau der Fructose lag mit $57 (\pm 8,4) \%$ deutlich unter dem durch die Studie von Crittenden und Playne (2002) erwartetem. Die Saccharose war nach 24 h zu $76 (\pm 19) \%$ abgebaut. Allerdings und entgegen der Studie von Crittenden und Playne (2002) wurde auch das FOS fermentiert. Nach 24 h waren bereits $51 (\pm 3,5) \%$ des Produktes abgebaut. Daraus wird deutlich, dass eine mikrobielle Aufreinigung des Produktgemischs mit Galacturonsäure-Fructosid mit *Zymomonas mobilis* nicht den erhofften Erfolg brachte. Ein Verlust von mehr als 50 % des Produktes ist nicht akzeptabel.

Tab. 5.11 Produktaufreinigung mit *Zymomonas mobilis* ATCC 39676: Abbaugrade der Zucker [%]

Glu [%]	Fru [%]	Sac [%]	GalA [%]	GalA-Fru [%]
$84 \pm 2,9$	$57 \pm 8,4$	76 ± 19	$39 \pm 0,6$	$51 \pm 3,5$

Es ist nicht davon auszugehen, dass die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen der Studie von Crittenden und Playne (2002) und dieser Arbeit auf die Immobilisierung der Zellen zurückzuführen sind, da die Immobilisierung nur dem Schutz der Zellen vor osmotischen Stress und zu hohen Ethanolkonzentrationen dient [Lee et al., 1994]. Sie kann nicht dafür verantwortlich sein, dass die Oligosaccharide in dem einem Fall abgebaut werden und in dem anderen nicht.

5.4.4. Analyse der neuartigen Fructooligosaccharide

Zur Strukturaufklärung wurden eindimensionale ^1H -, ^{13}C - und ^{13}C -DEPT-Spektren sowie Elektronenspray-Massenspektren (ESI-MS) aufgenommen. Das neue Produkt der Transfructosylierung ist ein α -D-Galacturonsäurepyranosyl-1,2- β -Fructofuranosid.

Im ESI-MS lässt sich ein Basispeak bei $m/z = 356,1$ für das Konjugat $[\text{M-H}]^-$ bzw. $[\text{M+Na}]^+$ erkennen (Anhang 10.3.).

5.4.5. Kapitelzusammenfassung

Die Aufreinigung biotechnologischer Produkte ist mit bis zu 80 % einer der kostentreibenden Faktoren in der Produktion [Farid, 2008; Gottschalk, 2006; Jagschies und O'Hara, 2007]. Daher ist die Wahl der geeigneten Methode zur Aufreinigung von Produkten von großer Bedeutung.

Die Untersuchungen von verschiedenen Zeolithen und Adsorbentien zur spezifischen Adsorption des Galacturonsäure-Fructosids waren nicht erfolgreich. Es konnte kein geeignetes Material gefunden werden, dass eine reaktionsintegrierte Aufreinigung des Produktes Galacturonsäure-Fructosid ermöglicht.

Für eine nachgeschaltete säulenchromatographische Aufreinigung des Produktes aus der Produktgemischlösung wurde das Kationenaustauschharz Amberlite CG-120 Na^+ (Eluent: Pufferlösung, pH 4,0) untersucht. Mit diesem konnte das Galacturonsäure-Fructosid mit einer Reinheit von 100 % gewonnen werden. Die Ausbeute betrug dabei 3,6 %. Dieser Ionenaustauscher ist allerdings aufgrund der hohen Materialkosten aus wirtschaftlicher Sicht für eine präparative Aufreinigung ungeeignet. Das Purolite-Harz PCR 642 Ca^+ ist hingegen eine kostengünstigere Alternative, da es bereits industrielle Anwendung findet bei der Separation von Glucose-Fructose-Gemischen und bei der Entfernung von Restzuckern aus Melasse [Purolite®]. Mit dem Purolite-Harz kann unter Verwendung einer sauren Pufferlösung als mobile Phase das Produkt in einer Reinheit von 100 % mit einer Ausbeute von 0,25 % gewonnen werden. Zur präparativen Gewinnung des Galacturonsäure-Fructosids mit geringerer Reinheit wurde eine Ausbeute von 44 % bei einer Reinheit von 75 % erzielt.

Untersuchungen zur mikrobiellen Aufreinigung der FOS-Produktlösung mittels *Zymomonas mobilis* ATCC 39676 zeigten, dass eine Reinigung der Produktlösung erfolgte, indem die

darin enthaltene Fructose, Glucose und Saccharose zu Ethanol und Kohlenstoffdioxid fermentiert wurden. Jedoch konnte auch ein Abbau des Produktes zu über 50 % beobachtet werden. Somit musste die mikrobielle Aufreinigung des FOS-Gemisches zur Gewinnung des Galacturonsäure-Fructosids verworfen werden, da ein so hoher Abbaugrad des Produktes aus dem Produktgemisch nicht akzeptabel ist.

Mittels NMR- und ESI-MS-Analyse konnte das neue FOS Galacturonsäure-Fructosid identifiziert werden. Es besitzt eine Molekularmasse von 356 g mol^{-1} .

5.5. Kontinuierliche Produktion der neuen Fructooligosaccharide

Ziel der Arbeit war die Etablierung eines kontinuierlichen Verfahrens zur Gewinnung des Galacturonsäure-Fructosids. Dabei sollte untersucht werden, ob eine reaktionsintegrierte Produktion und Aufarbeitung des Galacturonsäure-Fructosids möglich ist. Untersuchungen bezüglich der spezifischen Adsorption des Galacturonsäure-Fructosids an verschiedene dealuminierten Zeolithen haben gezeigt, dass eine reaktionsintegrierte Produktion des Produktes nicht möglich ist. Daher erfolgt die Aufreinigung des FOS in einem nachgeschalteten säulenchromatographischen Schritt.

5.5.1. Optimierung der kontinuierlichen Synthese des Galacturonsäure-Fructosids durch mathematische Simulation

Aus ökonomischer Sicht sind der Umsatz, die Ausbeute und die Produktivität die entscheidenden Parameter zur Wahl des geeigneten Betriebspunktes eines kontinuierlichen Prozesses. Dabei stellt die Produktivität das primäre Kriterium bei billigen Substraten dar. Bei teuren Substraten wird die Ausbeute stärker mit einbezogen.

Da mit Saccharose als Substrat eines der billigsten Naturprodukte zur Verfügung steht, sollte die Wahl des Betriebspunktes der kontinuierlichen Produktion des FOS besonders eine hohe Produktivität liefern.

Untersuchungen von König (2001) mit Alginatperlen (und immobilisierter Levansucrase) zur kontinuierlichen Synthese von FOS haben gezeigt, dass diese für den Einsatz im Rührreaktor (STR) ungeeignet waren. Die Alginatperlen wurden innerhalb kürzester Zeit von den Rührerblättern zerstört. Daher sollte hier die kontinuierliche Produktion des Galacturonsäure-Fructosids in einem Rohrreaktor untersucht werden.

Neben der Verwendung von Festbettreaktoren, wie z.B. dem MBRA [Ergezinger, 2005; Holtkamp, 2011; Jördening et al., 2005], eignen sich auch Wirbelschichtreaktoren zur kontinuierlichen Synthese. Sie haben gegenüber Festbettreaktoren die Vorteile, dass erheblich kleinere Trägerpartikel verwendet werden können und keine inhomogene Durchströmung des Reaktors (Kanalbildung) oder Verblockung der Hohlräume durch Schwebstoffe bzw. stark wachsende Biomasse stattfinden [Chmiel, 2011a; Pörtner, 2006b].

Das Fließbild (Abbildung 5.34) zeigt den Gesamtaufbau des Systems. In einer Wirbelschicht aus in Alginatperlen fixiertem Enzymadsorbat soll das FOS Galacturonsäure-Fructosid produziert werden. Durch Rückführung der Reaktionslösung über den Rückflussbehälter mit einem entsprechend höheren Volumenstrom als der Auslass ($F_2 = 5 \cdot F_1$) verhält sich der Reaktor wie ein CSTR [Behr et al., 2010; Briechle et al., 2011].

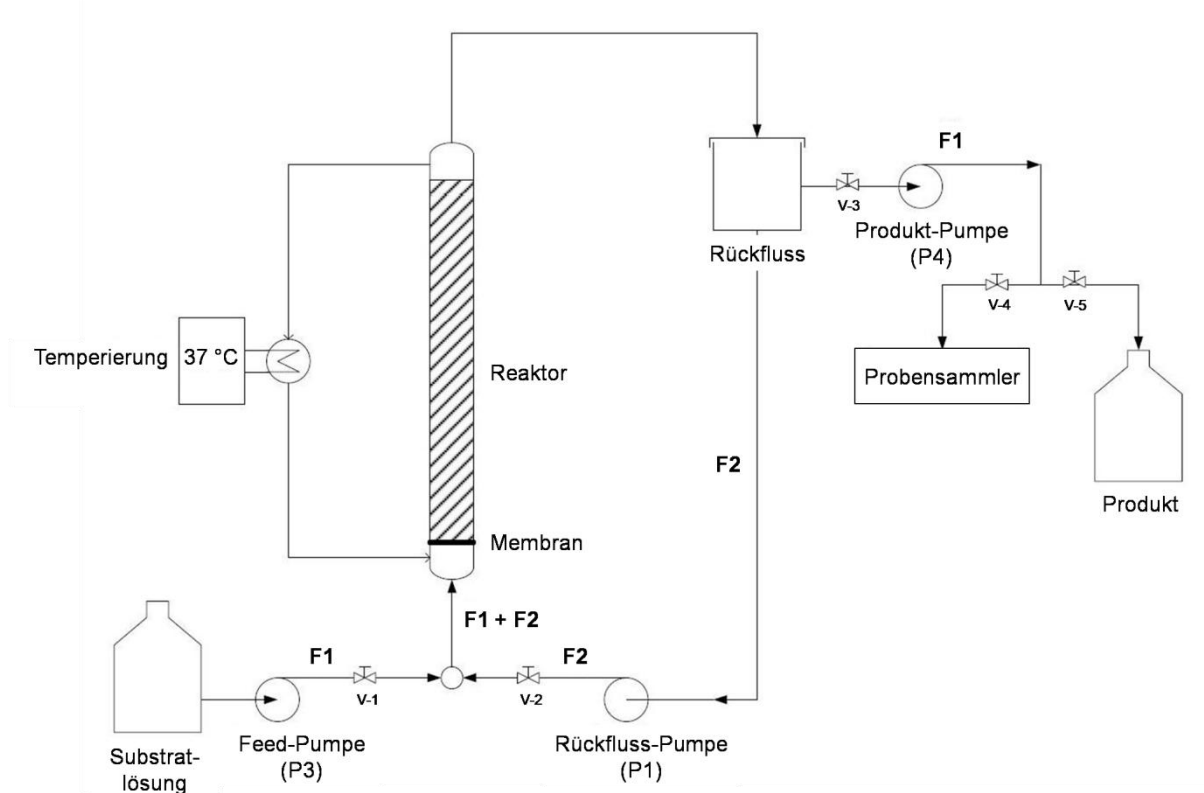


Abb. 5.34 Schematischer Aufbau des kontinuierlich betriebenen Systems zur Produktion von GalA-Fru

Die Substratzufuhr erfolgt von am Reaktorboden der mit immobilisierter *SacB* (Bentonit-Alginat-Immobilisate) befüllten Glassäule. Über die Pumpe P1 (P1) wird die Rezirkulation gewährleistet. Die Zuführung der Substratlösung und die Abführung der Produktlösung werden über die Pumpen P3 und P4 geregelt, wobei die Volumenströme identisch sind (F_1), und somit zwar das Volumen (Verweilzeit), nicht aber eine Volumenänderung im Rückflussbehälter berücksichtigt werden muss. Der Volumenstrom des Rückflusses (F_2) entspricht dem fünffachen des Substratzuflusses (F_1).

Das Modell zur Simulation der kontinuierlichen FOS Produktion kann allgemein durch Gleichung 5.14 beschrieben werden.

$$\frac{dc}{dt} = \frac{c_0}{\tau} - \left(\frac{dc}{dt} \right)_{\text{Enzymreaktion}} - \frac{c_t}{\tau} \quad (5.14)$$

Dabei bilden die Kinetik (Kapitel 5.3.) bzw. die ermittelten kinetischen Parameter der Bentonit-Alginat-Immobilisate der *SacB* (Kapitel 5.3.2.3.; Tabelle 5.4) die Grundlage zur Implementierung der Enzymreaktion im mathematischen Modell. Das Modell ermöglicht die Ermittlung der theoretisch zu erwartenden Umsätze und Ausbeuten bei verschiedenen Reaktionsbedingungen ($V_{\text{Reaktionssystem}}$; Volumenstrom; c_{Sac} ; c_{GalA}). Die Verweilzeit τ , der Umsatz X , die Ausbeute A bzw. die Produktivität Pr ergeben sich aus den Gleichungen 5.15 bis 5.18.

$$\tau = \frac{V_{\text{Reaktionssystem}}}{\dot{V}} \quad (5.15)$$

$$X = \frac{c_{S,0} - c_{S,t}}{c_{S,0}} \quad (5.16)$$

$$A = \frac{c_{P,t} - c_{P,0}}{c_{S,0}} \quad (5.17)$$

$$Pr = \frac{c_P}{\tau} \quad (5.18)$$

Mit der Definition des Volumens des Reaktionssystems (Abbildung 5.34) von 290 mL können für verschiedene Verweilzeiten bzw. Donor-Akzeptor-Konzentrationsverhältnisse mit dem Modell die zu erwartenden Umsätze, Produktivitäten und Ausbeuten ermittelt werden.

In Abbildung 5.35 ist die Abhängigkeit des Umsatzes von der Verweilzeit bei verschiedenen [Sac]:[GalA]-Verhältnissen dargestellt. Die Umsatzkurven fallen für die Konzentrationsverhältnisse von [Sac]:[GalA] = 100:500 und 100:250 und 100:100 (rote Kurve) bzw. für 250:500 und 250:100 (pinke Kurve) zusammen. Dies kann jedoch damit begründet werden, dass die Ermittlung der kinetischen Parameter (Kapitel 5.3.) keine Konkurrenz zwischen Galacturonsäure-Fructosid und Galacturonsäure um Saccharose aus genannten Gründen berücksichtigten konnte.

Unter Vernachlässigung der oben dargelegten Problematik, verdeutlicht die Abbildung, dass für die Konzentrationsverhältnisse von [Sac]:[GalA] ≤ 1 die Umsätze zur jeweiligen Verweilzeit höher sind als bei [Sac]:[GalA] > 1 .

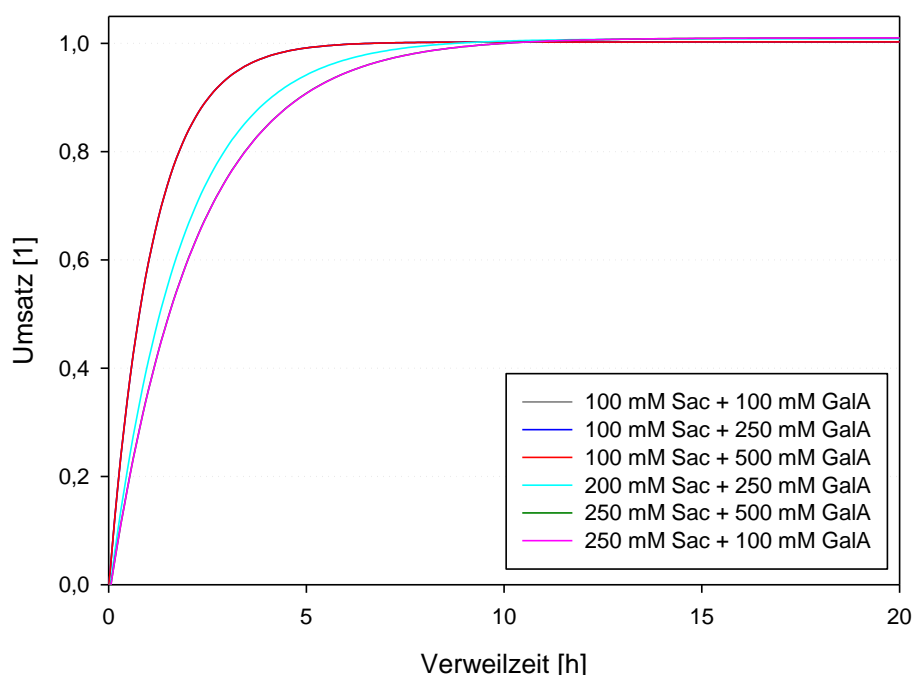


Abb. 5.35 Umsatz-Simulation der kontinuierlichen Synthese des GalA-Fru im Wirbelschichtreaktor mit Bentonit-Alginat-Immobilisaten für verschiedene Konzentrationsverhältnisse von Donor:Akzeptor ($V_{\text{Reaktionssystem}} = 290 \text{ mL}$)

Kapitel 5.4 beschreibt die Aufreinigung des FOS Galacturonsäure-Fructosids aus der Reaktionslösung. Dabei konnte gezeigt werden, dass besonders die Trennung zwischen dem Produkt und dem Akzeptor Galacturonsäure große Schwierigkeiten bereitet.

In Hinblick auf eine Optimierung der FOS Produktion und dessen anschließende Aufreinigung können aus dem Reaktionsmodell wichtige Erkenntnisse gewonnen werden. Eine kontinuierliche Produktion mit einer fünffach höheren Galacturonsäure-Konzentration verbessert die Ausbeute an Produkt bezogen auf den Akzeptor nicht. Dies ist ebenfalls darauf zurückzuführen, dass bei den ermittelten kinetischen Parametern (Kapitel 5.3.) keine Konkurrenz zwischen Galacturonsäure-Fructosid und Galacturonsäure um Saccharose einkalkuliert werden konnten. Ohne diese Berücksichtigung scheint es so, als würde die Ausbeute bezogen auf Galacturonsäure mit kleiner werdendem [Sac]:[GalA]-Verhältnis ebenfalls geringer werden (Abbildung 5.36).

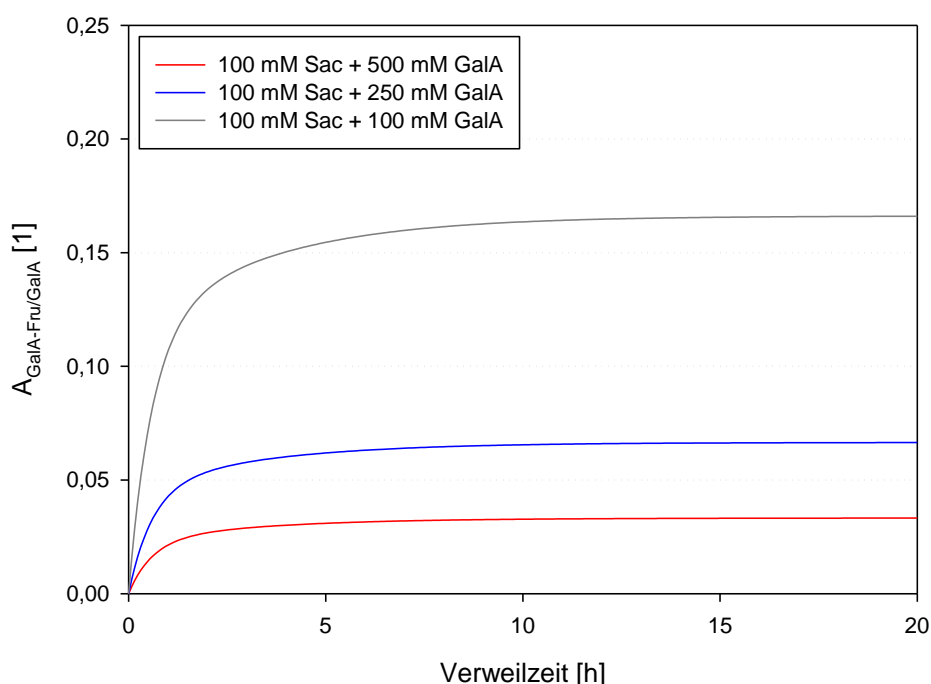


Abb. 5.36 Ausbeute-Simulation (bezogen auf den Akzeptor GalA) der kontinuierlichen Synthese des GalA-Fru im Wirbelschichtreaktor mit Bentonit-Alginat-Immobilisaten für $[\text{Sac}]:[\text{GalA}] = 100:100, 100:250$ und $100:500$ ($V_{\text{Reaktionssystem}} = 290 \text{ mL}$)

Ausgehend von den Ergebnissen der Simulation in Abbildung 5.36 wurde exemplarisch für die kontinuierliche Produktion des FOS bei einem Konzentrationsverhältnis von Donor:Akzeptor = 1 unter der Randbedingung einer hohen Substratkonzentration am Zulauf in Abhängigkeit von der Verweilzeit untersucht.

Abbildung 5.37 zeigt für das $[\text{Sac}]:[\text{GalA}]$ -Konzentrationsverhältnis von 500:500 mM den Umsatz, die Produktivität und die Ausbeute in Abhängigkeit von der Verweilzeit (mit: $V_{\text{Reaktionssystem}} = 290 \text{ mL}$). Zur Verweilzeit $\tau = 1,5 \text{ h}$ sind 37 % der maximalen Ausbeute bezogen auf Galacturonsäure bzw. Saccharose erreicht (Schnittpunkt der Produktivitäts- und Ausbeutekurve). Der Umsatz zu dieser Verweilzeit beträgt 26 %. Das entspricht einer Raum-Zeitausbeute von 117 mM h^{-1} (mit $V_{\text{Reaktionssystem}} = 290 \text{ mL}$). Die minimale Produktivität von 33 mM h^{-1} tritt nach einer Verweilzeit von 7,2 h ein. Zu dieser Zeit liegt 90 % der maximalen Ausbeute und ein Umsatz von 86 % vor.

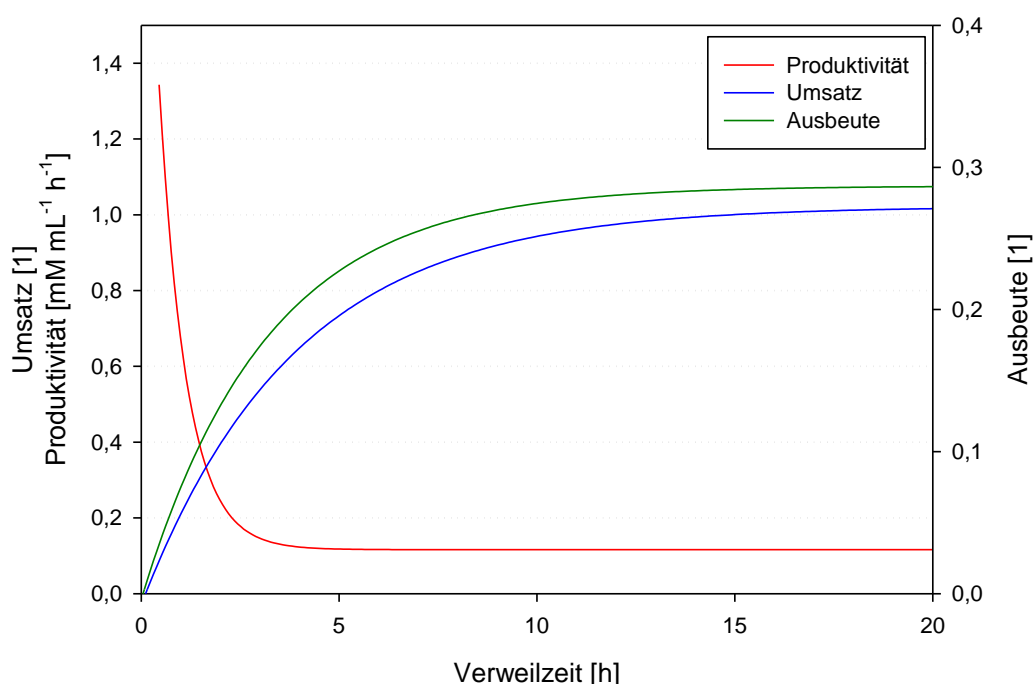


Abb. 5.37 Simulation der kontinuierlichen Synthese des GalA-Fru im Wirbelschichtreaktor mit Bentonit-Alginat-Immobilisaten bei [Sac]:[GalA] = 500:500 mM ($V_{\text{Reaktionssystem}} = 290 \text{ mL}$)

Unter Berücksichtigung der Verbesserung der Aufreinigung des Galacturonsäure-Fructosids sollte für die kontinuierliche Produktion des FOS ein Betriebspunkt gewählt werden, der eine möglichst hohe Ausbeute bezogen auf Galacturonsäure erzielt. Darüberhinaus sollte aber auch die Produktivität als Auswahlkriterium berücksichtigt werden. Das heißt, der optimale Betriebspunkt sollte zwischen einer Verweilzeit von 1,5 h und 7,2 h liegen. Ist eine 70 %ige Ausbeute bezogen auf Galacturonsäure eine hinreichende Voraussetzung, ergibt sich für das Reaktionssystem eine Verweilzeit von 4 h und eine Produktivität von 58 mM h^{-1} .

5.5.2. Kontinuierliche Synthese des Galacturonsäure-Fructosids

5.5.2.1. Aufbau des kontinuierlich betriebenen Systems zur Produktion von FOS

Abbildung 5.38 zeigt den Versuchsaufbau zur Umsetzung des Reaktorkonzeptes im Labor. Für die Zufuhr der Substratlösung, das Umpumpen des Reaktionsgemischs und der Auslass des Reaktors wurden Schlauchpumpen verwendet. Die Temperierung der Glassäule erfolgte über einen Thermostaten.

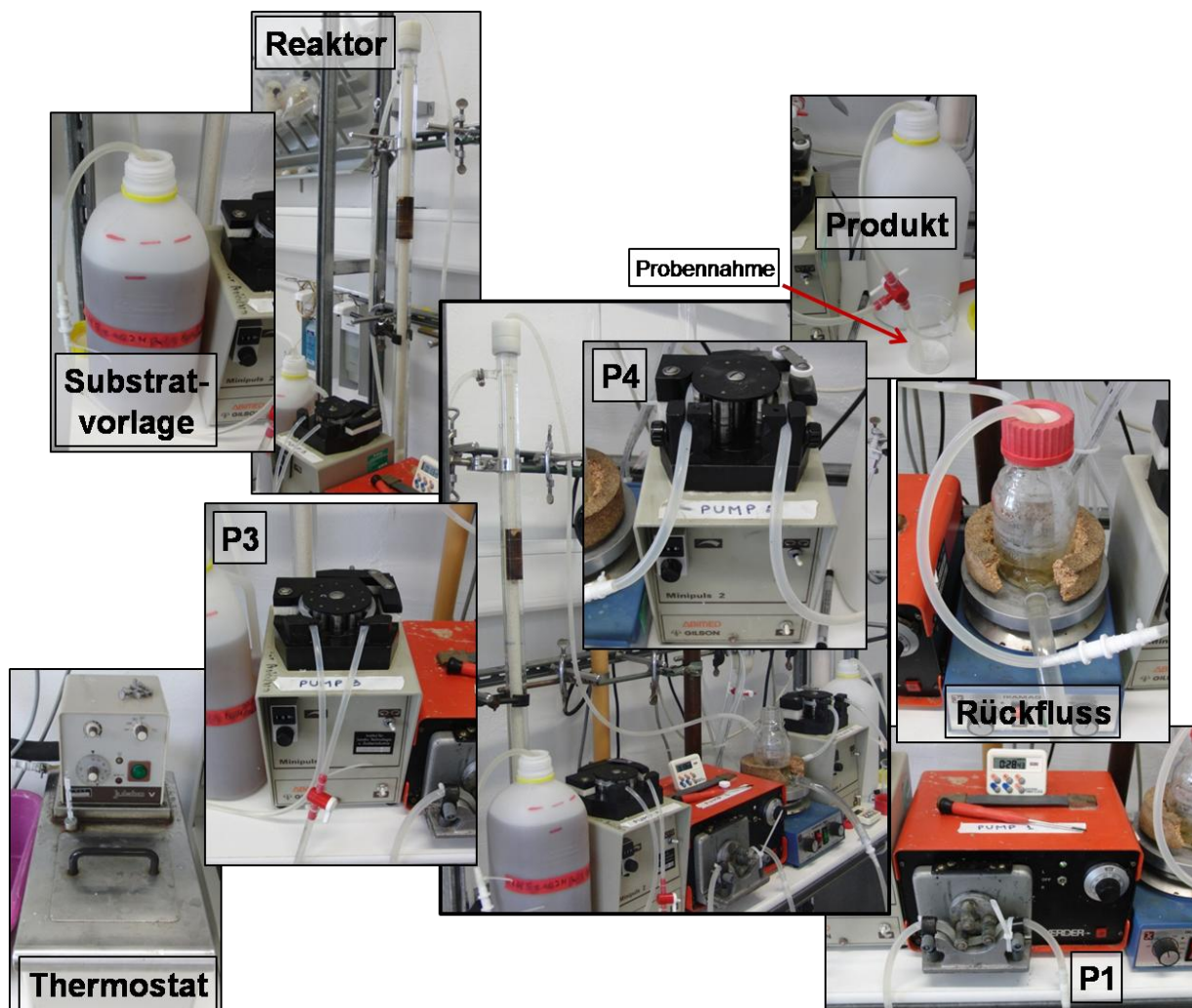


Abb. 5.38 Versuchsaufbau zur Umsetzung des Reaktorkonzeptes im Labor zur kontinuierlichen Produktion von GalA-Fru mit: P3: Feed-, P4: Produkt- und P1: Rückflusspumpe; Reaktor: $V_{\text{Reaktor}} = 180 \text{ mL}$, $d_{\text{innen}} = 1,6 \text{ cm}$, $d_{\text{außen}} = 3,3 \text{ cm}$, $L = 90 \text{ cm}$; $V_{\text{Reaktionssystem}} = 290 \text{ mL}$

5.5.2.2. Untersuchungen zur kontinuierlichen Synthese des Galacturonsäure-Fructosids

Die Bentonit-Alginat-Immobilisate der *SacB* waren für den Einsatz im Reaktor aufgrund ihrer Festigkeit und Kugelform sehr gut geeignet.

Die Reaktionsbedingungen der kontinuierlichen Umsetzung von Saccharose und Galacturonsäure zu dem FOS Galacturonsäure-Fructosid wurden zunächst analog den Standardbedingungen der batch-Versuche gewählt ($c_{\text{Sac}} = 200 \text{ mM}$, $c_{\text{GalA}} = 270 \text{ mM}$, 5 U mL^{-1} , 37 °C ; $12,2 \text{ U g}^{-1}$). Der Anteil des Bentonit-Alginat-Immobilisates im Reaktorvolumen betrug 74 % (= 134 mL Schüttvolumen).

Unter diesen Bedingungen war es nur sehr schwer möglich eine Wirbelschicht aufrechtzuerhalten. Die Perlen wurden zunehmend aus dem Reaktor ausgetragen. Um dies zu verhindern, wurde ein Sieb am Reaktorauslass eingesetzt, das jedoch zu einem enormen Druckverlust im Reaktor führte. Anstelle dessen wurde der Anteil an Immobilisat reduziert.

Bei Untersuchungen mit verringertem Perlenanteil auf 50 % des Reaktorvolumens ($3,4 \text{ U mL}^{-1}$) konnte zunächst eine Wirbelschicht aufgebaut werden. Jedoch verursachte die steigende Viskosität der Reaktionslösung ein Verkleben einzelner Perlen zu Agglomeraten, die aus der Schüttung herausgelöst wurden (Abbildung 5.39). Die Viskositätserhöhung könnte auf eine steigende Polymerkonzentration im Reaktor verursacht durch aus den Perlen ausgewaschenes Enzym hindeuten. Bei Langzeituntersuchungen der Bentonit-Alginat-Immobilisate im batch-Betrieb wurde kein Auswaschen des Enzyms beobachtet.

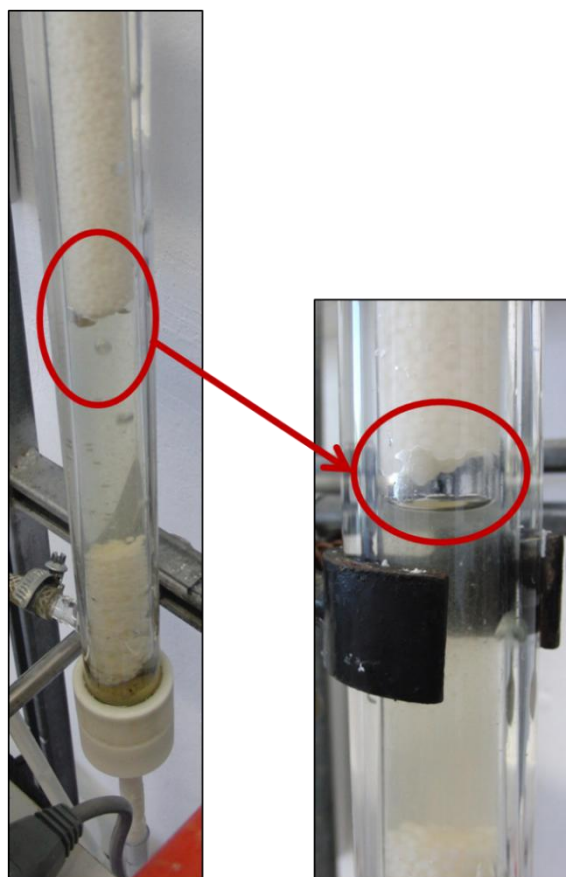


Abb. 5.39 Herausheben einzelner Immobilisatverbände aus der Wirbelschicht bei $V_{\text{Perlen}} = 50 \%$
 V_{Reaktor} ($V_{\text{Reaktionssystem}} = 290 \text{ mL}$; Aktivität = $12,2 \text{ U g}^{-1}_{\text{Perlen}}$; $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$; pH 6,6)

Durch eine weitere Verringerung der eingesetzten Menge an Bentonit-Alginat-Immobilisaten auf 20 % des Reaktorvolumens und damit einer Aktivität von $1,4 \text{ U mL}^{-1}$ konnte die in Abbildung 5.40 dargestellte Wirbelschicht aufgebaut werden.

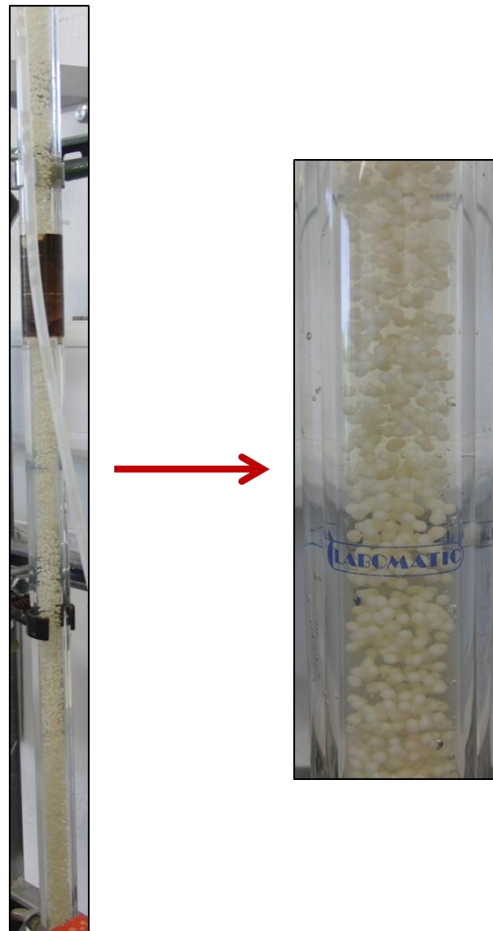


Abb. 5.40 Wirbelschicht der Bentonit-Alginat-Immobilisate der *SacB* ($V_{\text{Reaktionssystem}} = 290 \text{ mL}$; Aktivität = $12,2 \text{ U g}^{-1}_{\text{Perlen}}$; $V_{\text{Perlen}} = 20 \% V_{\text{Reaktor}}$; $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$; pH 6,6)

Leider konnten aus zeitlichen Gründen keine weiteren experimentellen Untersuchungen zur Etablierung der kontinuierlichen Produktion des FOS durchgeführt werden.

5.5.3. Kapitelzusammenfassung

Die Wahl des Betriebspunktes eines kontinuierlichen Prozesses ist für die Wirtschaftlichkeit des Prozesses von entscheidender Bedeutung. Dabei sind besonders der Umsatz, die Ausbeute und die Produktivität wichtige Parameter. Bei billigen Substraten, wie Saccharose, ist die Produktivität primäres Kriterium.

Für die kontinuierliche Produktion des Galacturonsäure-Fructosids wurde eine Optimierung der Randbedingungen des Prozesses durch mathematische Simulation durchgeführt. Diese ermöglicht die Bestimmung der zu erwartenden Prozessgrößen, wie Umsatz, Ausbeute und

Produktivität. Darüberhinaus gestattet sie eine Optimierung der Produktion des Galacturonsäure-Fructosids in Hinblick auf dessen Aufreinigung durch Optimierung der Betriebsparameter, wie [Sac]:[Gala]-Verhältnis und Verweilzeit.

Die Simulation der kontinuierlichen Produktion des FOS zeigt, dass die Wahl eines optimalen Betriebspunktes in Abhängigkeit von der maximal zu erwartenden Ausbeute bezogen auf Galacturonsäure und der maximal zu erwartenden Produktivität getroffen werden sollte. In Hinblick auf eine Optimierung der Aufreinigung des FOS sollte eine möglichst hohe Ausbeute bezogen auf Galacturonsäure realisiert werden.

Die Simulation der kontinuierlichen Produktion des FOS für verschiedene Donor-Akzeptor-Konzentrationsverhältnisse verdeutlicht, dass die Konkurrenz zwischen Galacturonsäure-Fructosid und Galacturonsäure um Saccharose nicht unberücksichtigt bleiben darf.

Daher sollte in weiterführenden Arbeiten die Gewinnung des FOS in Gram-Maßstäben optimiert werden, um Untersuchungen hinsichtlich Produkthydrolyse und Produkttransfructosylierung zu höheren FOS durchführen und in die Ermittlung der kinetischen Parameter einbeziehen zu können.

Abschließend wurden orientierende Untersuchungen zur kontinuierlichen Synthese des FOS durchgeführt. Es konnte ein Reaktionssystem bestehend aus einer Wirbelschicht aus in Alginatperlen fixiertem Enzymadsorbat aufgebaut werden, dass eine kontinuierliche Produktion des Galacturonsäure-Fructosids ermöglicht.

Die Bentonit-Alginat-Immobilisate der *SacB* waren für den Einsatz im Wirbelschichtreaktor aufgrund ihrer Festigkeit und Kugelform sehr gut geeignet. Leider konnten im Rahmen dieser Arbeit aus zeitlichen Gründen keine experimentellen Untersuchungen zur Verifikation der Simulation des Reaktionssystems durchgeführt werden.

Dennoch sollte hiermit die Grundlage für weiterführende Arbeiten zur Optimierung der kontinuierlichen Produktion des FOS geschaffen sein.

6. Zusammenfassung

Die biotechnologische Produktion von Oligosacchariden und insbesondere FOS gewinnt zunehmend an Bedeutung. Aufgrund ihrer präbiotischen Eigenschaften stellen sie interessante Produkte für die Pharma-, Kosmetik- und Ernährungsindustrie dar [Buchholz und Seibel, 2003].

Aus einer Fructosyltransferase-Bibliothek (SFB 578: AK Prof. Jahn (Institut für Mikrobiologie, TU Braunschweig), AK Prof. Dersch (Institut für Mikrobiologie, TU Braunschweig & HZI, Braunschweig) und AK Prof. Heinz (HZI, Braunschweig)) konnte die Fructosyltransferase *SacB* aus *Bacillus megaterium* als geeigneter Katalysator für die Transfructosylierung der Akzeptoren Isomaltulose, Xylose und Galacturonsäure ermittelt werden.

Dabei zeigen sich Unterschiede in der Akzeptorspezifität. Isomaltulose wird im Vergleich zu den beiden anderen Akzeptoren (Xylose, Galacturonsäure) weniger effektiv zu seinem FOS umgesetzt (Isomaltulose-Fructosid: 25 %). Die Umsätze der beiden anderen Akzeptoren zu ihren FOS betrugen: Xylosyl-Fructosid 80 % und Galacturonsäure-Fructosid 86 %.

Da bereits eine Reihe von Untersuchungen zur Bildung des Xylosyl-Fructosid durchgeführt wurden [Baciu et al., 2005; Beine et al., 2008 & 2009; Boehm et al., 2005; Hestrin und Avigad, 1958; Homann, 2009; Hoshi et al., 1994; Hsu et al., 2004; Seibel et al., 2005 & 2006b] und die Synthese des Isomaltulose-Fructosids relativ geringe Umsätze verzeichnete, wurden alle weiteren Untersuchungen mit dem Akzeptor Galacturonsäure durchgeführt.

Zur Etablierung einer kontinuierlichen Prozessführung wurde die Immobilisierung der Fructosyltransferase *SacB* (Rohextraktlösung) untersucht.

Die kovalente Bindung der *SacB* an den Epoxyträger Sepabeads® EC-EP resultierte in der Inaktivierung des Enzyms, die vermutlich auf inaktivierende Konformationsänderungen bzw. einer Blockierung des aktiven Zentrums zurückzuführen ist.

Die Adsorption der *SacB* an die Träger Bentonit bzw. Hydroxylapatit liefert in beiden Fällen aktive Immobilisate. Für den Träger Bentonit wurde eine maximale Aktivitätserhaltung von 100 % gefunden, für Hydroxylapatit nur von 40 %. Auch der Vergleich der jeweiligen Langmuir-Isothermen zeigt eine deutlich größere Beladungskapazität für Bentonit als für Hydroxylapatit ($q_{\max} = 0,5$ gegen $q_{\max} = 0,07$). Der Sorptionskoeffizient von Bentonit ist etwa

dreimal höher als der von Hydroxylapatit. Ausgehend von diesen Adsorptionsversuchen wurde Bentonit als geeigneter Träger zur Immobilisierung der *SacB* gewählt und für alle weiteren Untersuchungen verwendet. Die Adsorption der *SacB* auf dem Träger Bentonit lieferte Immobilisate mit einer maximalen Beladungsaktivität von $111 \text{ U mg}^{-1}_{\text{Träger}}$ bei einer Immobilisierungsausbeute von 20 %. Eine vollständige Immobilisierung (Ausbeute nahe 100 %) konnte bei einer Beladung von $44 \text{ U mg}^{-1}_{\text{Träger}}$ erzielt werden.

Um in einem kontinuierlich betriebenen System die Rückhaltung der *SacB* zu gewährleisten, wurde das an Bentonit adsorbierte Enzym anschließend in Alginat eingeschlossen. Damit konnte eine Vergrößerung der Partikel erzielt werden. Des Weiteren hat die Einkapselung der Bentonit-Immobilisate den Vorteil, dass das Enzym vor schädlichen äußeren Einflüssen wie mechanischen Stress geschützt werden kann.

Der Einschluss der Bentonit-Immobilisate in Alginat liefert aktive Immobilisate ($\varnothing = 1,0\text{-}1,9 \text{ mm}$) mit einer Restaktivität von $80 \pm 2 \%$, verglichen mit der Aktivität der nativen *SacB*. Durch den Zusatz von Microsil® konnte zum einen die Dichte der Perlen erhöht und zum anderen die Druckstabilität der Perlen verbessert werden. Ein negativer Einfluss des Additivs auf die Aktivität des Enzyms konnte nicht beobachtet werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Immobilisierung der *SacB* in zwei aufeinanderfolgenden Schritten (1. Adsorption an Bentonit, 2. anschließender Einschluss in Alginat) zu Immobilisaten führt, die für den Einsatz im kontinuierlich betriebenen System zur Produktion von FOS geeignet sind.

Zur kinetischen Beschreibung der *SacB* (nativ, adsorbiert, eingeschlossen nach Adsorption) wurde ein kinetisches Modell entwickelt, das die Bestimmung der kinetischen Parameter der Akzeptorreaktion mit Galacturonsäure zur Produktion des FOS Galacturonsäure-Fructosids ermöglicht. Die kinetischen Konstanten wurden dabei durch Integration nach Runge-Kutta in Kombination mit dem Simplexalgorithmus zur Parameteroptimierung ermittelt (Programm: ModelMaker3®; Cherwell Scientific Publishing Ltd.).

Für die Bildung des Galacturonsäure-Fructosids wurde dabei vom „Ping-Pong-Mechanismus“ ausgegangen [André et al., 2003; Chambert et al., 1974; Homann, 2009; Seibel et al., 2006c], und erweitert um Terme für Hydrolyse und Polymerbildung entsprechend den realen Reaktionsverläufen.

Die Konzentrationsverläufe der Akzeptorreaktionen der *SacB* konnten sowohl für das native, das adsorbierte als auch nach Adsorption in Alginat eingeschlossene Enzym gut durch das Reaktionsmodell beschrieben werden, obwohl aus genannten Gründen die Berücksichtigung der Hydrolyse des Galacturonsäure-Fructosids nicht erfolgen konnte. In weiterführenden Arbeiten sollte die Gewinnung des FOS in Gram-Maßstäben optimiert werden, um Untersuchungen hinsichtlich Produkthydrolyse und Produkttransfructosylierung zu höheren FOS durchführen und in die Ermittlung der kinetischen Parameter einbeziehen zu können.

Die mit dem Modell ermittelten kinetischen Parameter verdeutlichten, dass die Immobilisierung der Fructosyltransferase, sowohl durch Adsorption an Bentonit als auch anschließendem Einschluss in Alginat, einen Shift von Hydrolyse zur Produktbildung bewirkt. Die Hydrolyseraten der adsorbierten bzw. der eingeschlossenen *SacB* sind um 38 % bzw. 63 % geringer gegenüber der nativen *SacB*. Des Weiteren sind die Produktbildungsraten um die Faktoren 2,7 (Bentonit-Immobilisate) bzw. 1,1 (Bentonit-Alginat-Immobilisate) gegenüber der nativen *SacB* erhöht.

Untersuchungen auf Stofftransportlimitierungen der Bentonit-Alginat-Immobilisate der *SacB* lieferten einem Katalysatornutzungsgrad von 62 %.

Die Wahl der geeigneten Methode zur Aufreinigung von Produkten ist von großer Bedeutung, da die Aufreinigung biotechnologischer Produkte mit bis zu 80 % einer der kostentreibenden Faktoren in der Produktion ist [Farid, 2008; Gottschalk, 2006; Jagschies und O'Hara, 2007].

Die Untersuchungen von verschiedenen Zeolithen und Adsorbentien zur spezifischen Adsorption des Galacturonsäure-Fructosids waren nicht erfolgreich. Es konnte kein geeignetes Material gefunden werden, dass eine reaktionsintegrierte Aufreinigung des Produktes Galacturonsäure-Fructosid ermöglicht.

Für eine nachgeschaltete säulenchromatographische Aufreinigung des Produktes aus der Produktgemischlösung wurde das Kationenaustauschharz Amberlite CG-120 Na⁺ (Eluent: Pufferlösung, pH 4,0) untersucht. Mit diesem konnte das Galacturonsäure-Fructosid mit einer Reinheit von 100 % gewonnen werden. Die Ausbeute betrug dabei 3,6 %. Dieser Ionenaustauscher ist allerdings aufgrund der hohen Materialkosten aus wirtschaftlicher Sicht für eine präparative Aufreinigung ungeeignet. Das Purolite-Harz PCR 642 Ca⁺ ist hingegen eine kostengünstigere Alternative, da es bereits industrielle Anwendung findet bei der

Separation von Glucose-Fructose-Gemischen und bei der Entfernung von Restzuckern aus Melasse [Purolite®]. Mit dem Purolite-Harz kann unter Verwendung einer sauren Pufferlösung als mobile Phase das Produkt in einer Reinheit von 100 % mit einer Ausbeute von 0,25 % gewonnen werden. Zur präparativen Gewinnung des Galacturonsäure-Fructosids mit geringerer Reinheit wurde eine Ausbeute von 44 % bei einer Reinheit von 75 % erzielt.

Untersuchungen zur mikrobiellen Aufreinigung der FOS-Produktlösung mittels *Zymomonas mobilis* ATCC 39676 zeigten, dass eine Reinigung der Produktlösung erfolgte, indem die darin enthaltene Fructose, Glucose und Saccharose zu Ethanol und Kohlenstoffdioxid fermentiert wurden. Jedoch konnte auch ein Abbau des Produktes zu über 50 % beobachtet werden. Somit musste die mikrobielle Aufreinigung des FOS-Gemisches zur Gewinnung des Galacturonsäure-Fructosids verworfen werden, da ein so hoher Abbaugrad des Produktes aus dem Produktgemisch nicht akzeptabel ist.

Mittels NMR- und ESI-MS-Analyse konnte das neue FOS Galacturonsäure-Fructosid identifiziert werden. Es besitzt eine Molekularmasse von 356 g mol^{-1} .

Die Wahl des Betriebspunktes eines kontinuierlichen Prozesses ist für die Wirtschaftlichkeit des Prozesses von entscheidender Bedeutung. Dabei sind besonders der Umsatz, die Ausbeute und die Produktivität wichtige Parameter. Bei billigen Substraten, wie Saccharose, ist die Produktivität primäres Kriterium.

Für die kontinuierliche Produktion des Galacturonsäure-Fructosids wurde eine Optimierung der Randbedingungen des Prozesses durch mathematische Simulation durchgeführt. Diese ermöglicht die Bestimmung der zu erwartenden Prozessgrößen, wie Umsatz, Ausbeute und Produktivität. Darüber hinaus gestattet sie eine Optimierung der Produktion des Galacturonsäure-Fructosids in Hinblick auf dessen Aufreinigung durch Optimierung der Betriebsparameter, wie [Sac]:[GalA]-Verhältnis und Verweilzeit.

Die Simulation der kontinuierlichen Produktion des FOS zeigt, dass die Wahl eines optimalen Betriebspunktes in Abhängigkeit von der maximal zu erwartenden Ausbeute bezogen auf Galacturonsäure und der maximal zu erwartenden Produktivität getroffen werden sollte. In Hinblick auf eine Optimierung der Aufreinigung des FOS sollte eine möglichst hohe Ausbeute bezogen auf Galacturonsäure realisiert werden.

Die Simulation der kontinuierlichen Produktion des FOS für verschiedene Donor-Akzeptor-Konzentrationsverhältnisse verdeutlicht, dass die Konkurrenz zwischen Galacturonsäure-Fructosid und Galacturonsäure um Saccharose nicht unberücksichtigt bleiben darf.

Daher sollte in weiterführenden Arbeiten die Gewinnung des FOS in Gram-Maßstäben optimiert werden, um Untersuchungen hinsichtlich Produkthydrolyse und Produkttransfructosylierung zu höheren FOS durchführen und in die Ermittlung der kinetischen Parameter einbeziehen zu können.

Abschließend wurden orientierende Untersuchungen zur kontinuierlichen Synthese des FOS durchgeführt. Es konnte ein Reaktionssystem bestehend aus einer Wirbelschicht aus in Alginatperlen fixiertem Enzymadsorbat aufgebaut werden, das eine kontinuierliche Produktion des Galacturonsäure-Fructosids ermöglicht. Die Bentonit-Alginat-Immobilisate der *SacB* waren für den Einsatz im Wirbelschichtreaktor aufgrund ihrer Festigkeit und Kugelform sehr gut geeignet. Leider konnten im Rahmen dieser Arbeit aus zeitlichen Gründen keine experimentellen Untersuchungen zur Verifikation der Simulation des Reaktionssystems durchgeführt werden.

Dennoch sollte hiermit die Grundlage für weiterführende Arbeiten zur Optimierung der kontinuierlichen Produktion des FOS geschaffen sein.

7. Literaturverzeichnis

- Albayrak, N., Yang, S.-T. (2002) Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase on tosylated cotton cloth; *Enz. Microb. Technol.* 31(4): 371-383
- Alcalde, M., Plou, F.J., Gómez de Segura, A., Remaud-Simeon, M., Willemot, R.M., Monsan, P., Ballesteros, A. (1999) Immobilization of native and dextran-free dextransucrases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F for the synthesis of glucoseoligosaccharides; *Biotechnol. Techn.* 13(11): 749-755
- Anderson, M.W., Klinowski, J. (1986) Zeolites treated with silicon tetrachloride vapor. 2 sorption studies; *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1* (82): 3569-3586
- André, I., Tvaroška, I., Carver, J.P. (2003) On the reaction pathways and determination of transition-state structures for retaining α -galactosyltransferases; *Carbohydr. Res.* 338 (9): 865-877
- Antranikian, G. (2006) „Die industrielle Biotechnologie – gegenwärtiger Stand in Forschung und Technik“; Auf: *Weißer Biotechnologie – Ökonomische und ökologische Chancen*; Dokumentation der vom Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, dem Umweltbundesamt und der deutschen Industrievereinigung Biotechnologie gemeinsam veranstalteten Fachtagung; Bundespresseamt; Berlin, Herausgeber: Dubbert, W., Fachgebiet III 2.3K Chemische Industrie, Energieerzeugung, Dessau; Heine, T., Deutsche Industrievereinigung Biotechnologie, Frankfurt am Main
- Arrhenius, S. (1889) Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker zu Säuren; *Z. Phys. Chemie* 4: 226-248
- Arrigoni, E., Amadò, R. (2009) Chemische und physiologische Aspekte von Nahrungskohlenhydraten; *EEK – Kohlenhydratbericht* (1); *SZE* 03: 8-14
- Atkins, P.W., de Paula, J. (2010) *Physikalische Chemie*; Wiley-VCH Verlag, 4. Aufl.; Weinheim
- Avigad, G., Feingold, D.S., Hestrin, S. (1957) Enzymatic synthesis and reactions of sucrose isomer α -D-galactopyranosyl- β -D-fructofuranoside; *J. Biol. Chem.* 224: 295-307
- Bachmann, R., Budde, F., Riese, J. (2004) Die dritte Welle – Die Biotechnologie erobert die Chemieindustrie; *Chem. Ing. Tech.* 76(8): 1155-1158
- Baciu, I.E. (2005) Extracted sugar-beet pulp and sucrose, two renewable materials as “hot” substrates for enzymatic synthesis of valuable saccharides; *Phd. thesis*, TU Braunschweig
- Baciu, I.E., Jördening, H.-J., Buchholz, K. (2005) Investigations of the transfructosylation reaction by fructosyltransferase from *B. subtilis* NCIMB 11871 for the synthesis of the sucrose analogue galactosyl-fructose; *J. Biotechnol.* 116(4): 347-357

- Bailey, J., Ollis, D.F. (1986) Biochemical Engineering Fundamentals; 2nd Edition, McGraw Hill, New York
- Barrer, R.M. (1978) Zeolites and clay minerals as sorbents and molecular sieves; Academic Press, London, UK
- Bathen, D.; Breitbach, M. (2001) Adsorptionstechnik; Springer Verlag, Berlin [u.a.]
- Behr, A., Agar, D.W., Jörisen, J. (2010) Einführung in die Technische Chemie; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Beine, R., Moraru, R., Nimtz, M., Na'amnieh, S., Pawlowski, A., Buchholz, K., Seibel, J. (2008) Synthesis of novel fructooligosaccharides by substrate and enzyme engineering; J. Biotechnol. 138(1-2): 33-41
- Beine, R., Valente, A.R., Biedendieck, R., Jahn, D., Seibel, J. (2009) Directed optimization of biocatalytic transglycosylation processes by the integration of genetic algorithms and fermentative approaches into a kinetic model; Proc. Biochem. 44(10): 1103-1114
- BENEO-Palatinit: www.beneo-palatinit.com
- Berensmeier, S., Buchholz, K. (2004) Separation of isomaltose from high sugar concentrated enzyme reaction mixture by dealuminated [beta]-zeolite; Sep. Purif. Technol. 38(2): 129-138
- Berensmeier, S., Ergezinger, M., Bohnet, M., Buchholz, K. (2004) Design of immobilised dextranucrase for fluidised bed application; J. Biotechnol. 114 (3): 255-267
- Bernardi, G., Giro, M.G., Gaillard, C. (1972) Chromatography of polypeptides and proteins on hydroxyapatite columns: some new developments; Biochim. Biophys. Acta 278 (3): 409-420
- Biedendieck, R. (2007) *Bacillus megaterium*: Versatile tool for production, secretion and purification of recombinant proteins; Phd. thesis, TU Braunschweig
- Biedendieck, R. (2010) "Vektordaten von *SacB* aus *Bacillus megaterium*"; persönliche Mitteilung vom 28.10.2010; Institut für Mikrobiologie, TU Braunschweig
- Biokraft-NachV (2009) Verordnung über Anforderungen an eine nachhaltige Herstellung von Biokraftstoffen (Biokraftstoff-Nachhaltigkeitsverordnung – Biokraft-NachV) vom 30. September 2009; BGBl. I S. 3182
- Bio-Rad: <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/LIT-174B.pdf>
- Biselli, M. (1991) Enzymkatalysierte Racematspaltung von Aminosäuren mit integrierter Rückführung, dargestellt am Beispiel der Umsetzung von D, L-alanin zu L-Alanin; Phd. thesis; Rheinische Friedrich Wilhelms Universität Bonn

- Bisswanger, H. (2000) Enzymkinetik: Theorie und Methoden; Wiley-VCH Verlag, 3. Aufl.; Weinheim [u.a.]
- Boehm, G., Stahl, B., Jelinek, J., Knol, J., Miniello, V., Moro, G.E. (2005) Prebiotic carbohydrates in human milk and formulas; *Acta Paediatr. Suppl.* 94(449): 18-21
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteindye binding; *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- Breck, D.W. (1964) Crystalline molecular sieves; *J. Chem. Educ.* 41(12): 678-689
- BRENDA: BRAunschweig ENzyme DAtabase – The Comprehensive Enzyme Information System; www.brenda-enzymes.org
- Briechele, S., Howaldt, M., Röthig, T., Liese, A. (2011) „Enzymatische Prozess“; In: *Bioprozesstechnik, Kapitel 12*; Chmiel, H., eds., Spektrum Akademischer Verlag, 3. Aufl.; Heidelberg, p. 427-476
- Buchholz, K. (1989) Immobilisierte Enzyme – Kinetik, Wirkungsgrad und Anwendung; *Chem. Ing. Tech.* 61(8): 611-620
- Buchholz, K., Kasche, V., Bornscheuer U.T. (2005) Biocatalysts and enzyme technology, Wiley-VCH Verlag, Weinheim
- Buchholz, K., Seibel, J. (2003) „Isomaltooligosaccharides“; In: *Oligosaccharides in Food and Agriculture, Chapter 6*; G. Eggleston & G.L. Cote, eds., American Chemical Society; Washington, p. 63-75
- Buttersack, C., Fornefett, I., Mahrholz, J., Buchholz, K. (1997) “Specific Adsorption from Aqueous Phase on Apolar Zeolithes”; In: *Studies in Surface Science and Catalysis, Vol. 105: Progress in Zeolite and Microporous Materials, Preceedings of the 11th International Zeolite Conference*; Chon, H., Ihm, S.K., Uh, Y.S., eds., Elsevier Science, p. 1723-1730
- Buttersack, C., Laketic, D. (1995) “Hydrolysis of disaccharides by dealuminated Y-zeolites”; In: *Zeolite Science: Recent Progress and Discussions – Supplementary Materials to the 10th International Zeolite Conference, Garmisch-Patenkirchen, Germany, July 17-22th 1994*; Weitkamp, H.G.K.A.J., eds., Elsevier, 1995
- Buttersack, C., Rudolph, H., Mahrholz, J., Buchholz, K. (1996) High specific interaction of polymers with the pores of hydrophobic zeolites; *Langmuir* 12(13): 3101-3106
- Buttersack, C., Wach, W., Buchholz, K. (1993) Specific adsorption of saccharides by dealuminated Y-zeolites; *J. Phys. Chem.* 97(46): 11861-11864
- Buttersack, C., Wach, W., Buchholz, K. (1994) “Adsorption of Glucose and Fructose Containing Disaccharides on Different Faujasites”; In: *Studies in Surface Science and*

- Catalysis, Vol. 84: Zeolites and Related Microporous Materials: State of the Art 1994 - Proceedings of the 10th International Zeolite Conference, Garmisch-Partenkirchen, Germany*; Weitkamp, J., Karge, H.G., Pfeifer, H., Hölderich, W., eds., Elsevier Science, p. 1363-1371
- Chambert, R., Gonzy-Tréboul, G. (1976) Levansucrase of *Bacillus subtilis*: kinetic and thermodynamic aspects of transfructosylation process; *Eur. J. Biochem.* 62(1): 55-64
- Chambert, R., Petit-Glatron, M.F. (1991) Polymerase and hydrolase activities of *Bacillus subtilis* levansucrase can be separately modulated by site-directed mutagenesis; *Biochem. J.* 279: 35-41
- Chambert, R., Petit-Glatron, M.F. (1989) Study of the effect of organic solvents on the *Bacillus subtilis* levansucrase; *Carbohydr. Res.* 191(1): 117-123
- Chambert, R., Petit-Glatron, M.F. (1993) Immobilization of Levansucrase on calcium phosphate gel strongly increases its polymerase activity; *Carbohydr. Res.* 244(1): 129-136
- Chambert, R., Tréboul, G., Dedonder, R. (1974) Kinetic studies of levansucrase of *Bacillus subtilis*; *Eur. J. Biochem.* 41(2): 285-300
- Cheetham, P.S.J., Hacking, A.J., Vlitos, M. (1989) Synthesis of novel disaccharides by a newly isolated fructosyltransferase from *Bacillus subtilis*; *Enz. Microb. Technol.* 11(4): 212-219
- Chmiel, H. (2011a) „Bioreaktoren“; In: *Bioprozesstechnik, Kapitel 7*; Chmiel, H., eds., Spektrum Akademischer Verlag, 3. Aufl.; Heidelberg, p. 197-236
- Chmiel, H. (2011b) „Aufarbeitung (Downstream Processin)“; In: *Bioprozesstechnik, Kapitel 10*; Chmiel, H., eds., Spektrum Akademischer Verlag, 3. Aufl.; Heidelberg, p. 295-369
- Chu, D.H., Kumugai, H., Nakamura, K. (1998) Application of polyelectrolyte complex gel composed of xanthan and chitosan to the immobilization of *corynebacterium glutamicum*; *J. Appl. Polym. Sci.* 60(7): 1041-1047
- Cleland, W.W. (1963a) The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products: I. Nomenclature and rate equations; *Biochem. Biophys. Acta* 67: 104-137
- Cleland, W.W. (1963b) The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products: II. Inhibition: Nomenclature and theory; *Biochem. Biophys. Acta* 67: 173-187
- Cleland, W.W. (1963c) The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products: III. Prediction of initial velocity and inhibition patterns by inspection; *Biochem. Biophys. Acta* 67: 188-196

- Cote, G.L., Ahlgren, J. (1993) Metabolism in microorganism, Part I. Levan and levansucrase; In: *Science and Technology of Fructans*; Suzuki, M., Chatterton, N.J., Eds.; CRC Press, Boca Raton, FL, p. 141-168
- Crittenden, R.G., Playne, M.J. (2002) Purification of food-grade oligosaccharides using immobilised cells of *Zymomonas mobilis*; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58: 297-302
- Dahlquist, F.W., Rand-Meir, T., Raftery, M.A. (1968) Demonstration of carbonium ion intermediate during lysozyme catalysis; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 61(4): 1194-1198
- Damköhler, G. (1937) Influence of diffusion, fluid flow, and heat transport on the yield in chemical reactors; *Der Chemie Ingenieur* 3: 359-485; translated in *Int. Chem. Eng.* 28: 132-198 (1988)
- Database of Carbohydrate-Active enZymes (CAZY); <http://www.cazy.org>
- Database of Zeolite Structures; <http://www.iza-structure.org/databases>
- Dedonder, R. (1966) Levansucrase from *Bacillus subtilis*; *Methods Enzymol.* 8(86): 500-505
- DEI (2006) Wellness-Zucker aus Rüben; *Die Ernährungsindustrie*, Ausgabe: 03/2006, p. 18
- DEI (2007) Nicht kariogene Zuckerart; *Die Ernährungsindustrie*, Ausgabe: 11/2007, p. 6
- Dietrich, C.P. (1968) Novel heparin degradation products. Isolation and characterization of novel disaccharides and oligosaccharides produced from heparin by bacterial degradation; *Biochem. J.* 108(4): 647-654
- Doelle, H.W., Kirk, L., Crittenden, R., Toh, H., Doelle, M.B. (1993) *Zymomonas mobilis* – science and industrial application; *Crit. Rev. Biotechnol.* 13(1): 57-98
- Doner, L.W., Irwin, P.L., Kurantz, M.J. (1988) Preparative chromatography of oligogalacturonic acids; *J. Chromatogr. A* 449: 229-239
- Doran, P.M. (1995) *Bioprocess engineering principles*; Academic Press, London [u.a.]
- Dorozhkin, S.V., Epple, M. (2002) Die biologische und medizinische Bedeutung von Calciumphosphaten; *Angew. Chem.* 114(17): 3260-3277
- Dwek, R.A. (1996) "Glycobiology: A quantum leap in carbohydrate chemistry"; In *Foundations of modern biochemistry*, Vol. 2; Chapter 7 pp 153-202
- Erhardt, F.A. (2008) Tailor-made biocatalysts for integrated adsorption and synthesis of saccharides in a multiphase reactor; Phd. thesis, TU Braunschweig
- Erhardt, F.A., Jördening, H.-J. (2007) Immobilization of dextranase from *Chaetomium erraticum*; *J. Biotechnol.* 131(4): 440-447

- Elling, L. (1997) Glycobiotechnology: Enzymes for the Synthesis of Nucleotide Sugars; Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 58: 89-144
- Ergezinger, M. (2005) Integrierte enzymatische Produktion und Adsorption von Isomaltose in einem Mehrphasenreaktor; Phd. thesis, TU Braunschweig
- Ergezinger, M., Bohnet, M., Berensmeier, S., Buchholz, K. (2005) Integrierte enzymatische Synthese und Adsorption von Isomaltose in einem Mehrphasenreaktor; Chem. Ing. Tech. 77(1-2): 167-171
- Ernst, B., Hart, G.W., Sinaÿ, P. (2000) Carbohydrates in chemistry and biology; Wiley-VCH Verlag, Weinheim [u.a.]
- Euzenat, O., Guibert A., Combes, D. (1998) Production and purification of *Bacillus subtilis* C4 Levansucrase: Kinetic characterization of the enzyme; Ann. N.Y. Acad. Sci. 864(1): 288-294
- Farid, S.S. (2008) Economic drivers and trade-offs in antibody purification processes; BioPharm International, March 2
- Feingold, D.S., Avigad, G., Hestrin, S. (1956) The mechanism of polysaccharide production from sucrose. 4. Isolation and probable structures of oligosaccharides formed from sucrose by levansucrase system; Biochem. J. 64: 351-361
- Festel, G. (2003) Marktstudie zum Einfluss der Biotechnologie auf industrielle Produktionsverfahren; Interviewergebnisse; Schlussfolgerungen und Fazit; FESTEL CAPITAL; www.festel.de
- Festel, G., Knöll, J., Götz, H. (2004) Weiße Biotechnologie – Chemikalien aus dem Fermenter; Nachrichten aus der Chemie 52(2): 166-167
- Festel, G., Knöll, J., Götz, H. (2004) Potential der industriellen Biotechnologie umsetzen; Transkript 10(1-2): 21-22
- Festel, G., Knöll, J., Götz, H., Zinke, H. (2004) Der Einfluß der Biotechnologie auf Produktionsverfahren in der Chemieindustrie; Chem. Ing. Tech. 76(3): 304-312
- Flaschel, E., Bott, M., Buchholz, S., Daußmann, T., Gent, R., Karos, M., Liese, A., Renken, E., Reuss, M., Scriba, A., Sell, D., Sylđatk, C., Takors, R., Ulber, R., Zinke, H. (2004) Weiße Biotechnologie: Chancen für Deutschland; Positionspaper der DECHEMA e.V.
- Flodin, P., Aspberg, K. (1961) „Separation of Oligosaccharides with Gel Filtration”; In: *Biological structure and function, Vol. 1*; Goodwin, T.W., Lindberg, O., eds.; Academic Press, New York, p. 345-349
- Flodin, P., Gregory, J.D., Rodén, L. (1964) Separation of acidic oligosaccharides with gel filtration; Anal. Biochem. 8(4): 424-433

- Frey, I., Arrigoni, E., Amadò, R. (2001) Kritische Betrachtung von Pro- und Präbiotika anhand von Humanstudien; Ernährung/ Nutr. 25: 485-501
- Gagnon, P., Frost, R., Tunón, P., Ogawa, T. (2009) CHT™ Ceramic Hydroxyapatite - A New Dimension in Chromatography of Biological Molecules, Rev C.; Bulletin-Nr. 2156; Bio-Rad
- Ghazarian, H., Idoni, B., Oppenheimer, S.B. (2011) A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics; Acta Histochemica 113(3): 236-247
- Ghazi, I., Gómez de Segura, A., Fernández-Arrojo, L., Alcalde, M., Yates, M., Rojas-Cervantes, M.L., Plou, F.J., Ballesteros, A. (2005) Immobilization of fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus* on epoxy-activated sephabeads EC for the synthesis of fructo-oligosaccharides; J. Molec. Catal. B: Enzym. 35(1-3): 19-27
- Gibson, G.R. (1999) Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin; J. Nutr. 129(7): 1438-1441
- Gibson, G.R., Beatty, E.B., Wang, X., Cummings, J.H. (1995) Selective stimulation of *Bifidobacteria* in the human colon by oligofructose and inulin; Gastroenterology 108 (4): 975-982
- Gibson, G.R., Roberfroid, M.B. (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics; J. Nutr. 125(6): 1401-1412
- Gemeiner, P. (1992) Enzyme engineering: immobilized biosystems; Gemeiner, P., eds.; Ellis Horwood, New York [u.a.]
- Gottschalk, U. (2006) The renaissance of protein purification; BioPharm International, June 2
- Greaves, M.P., Wilson, M.J. (1969) The adsorption of nucleic acids by montmorillonite; Soil Biol. Biochem. 1(4): 317-323
- Griffin, I.J., Hicks, P.M.D., Heaney, R.P., Abrams, S.A. (2003) Enriched chicory inulin increases calcium absorption mainly in girls with lower calcium absorption; Nutr. Res. 23 (7): 901-909
- Grim, R.E., Güven, N. (1978) Bentonites: Geology, Mineralogy, Properties and Uses; Developments in Sedimentology Vol. 24; Elsevier, Amsterdam; p. 1-256
- Grünewald, E., Prüße, U., Vorlop, K.-D. (2009) Goldene Zeiten für Zucker: Goldkatalysatoren veredeln Zucker zu Industrie-Produkten; ForschungsReport 01/2009; Zeitschrift den Senats der Bundesforschungsinstitute; p. 22-25
- Guillon, F., Champ, M. (2000) Structural and physical properties of dietary fibres, and consequences of processing on human physiology; Food Res. Int. 33(3-4): 233-245

- Guire, P.E. (1971) Fractionation of oligosaccharides by polyacrylamide gel filtration; Proc. Okla. Acad. Sci. 51: 63-65
- Guisan, J.M. (2006) Immobilization of Enzymes and Cells (Methods in Biotechnology); 2nd Edition, Humana Press, Totowa, NJ
- Han, W.C., Byun, S.H., Kim, M.H., Sohn, E.H., Lim, J.D., Um, B.H., Kim, C.H., Kang, S.A., Jang, K.H. (2009) Production of lactosucrose from sucrose and lactose by a Levansucrase from *Zymomonas mobilis*; J. Microbiol. Biotechnol. 19(10): 1153-1160
- Hart, H. (1989) Organische Chemie: ein kurzes Lehrbuch; Wiley-VCH Verlag, Weinheim [u.a.]
- Hartmeier, W. (1985) Immobilisierte Biokatalysatoren – auf dem Weg zur zweiten Generation; Naturwissenschaften 72(6): 310-314
- Hartmeier, W. (1986) Immobilisierte Biokatalysatoren: eine Einführung; Springer Verlag, Berlin [u.a.]
- Hatti-Kaul, R., Tornvall, U., Gustafsson, L., Borjesson, P. (2007) Industrial biotechnology for the production of bio-based chemicals – a cradle-to-grave perspective; Trends Biotechnol. 25(3): 119-124
- Hayes, C. (2001) The effect of non-cariogenic sweeteners on the prevention of dental caries: a review of the evidence; J. Dent. Educ. 65(10): 1106-1109
- Heftman, E. (1985) "Chromatography: fundamentals and applications of chromatographic and electrophoretic methods, Part B: Applications"; In: *J. Chromatogr. Library Vol. 22B*; Elsevier Sci. Ltd.
- Hehre, E.J. (1941) Production from sucrose of a serologically reactive polysaccharide by a sterile bacterial extract; Science 93(2410): 237-238
- Hendry, G.A.F., Wallace, R.K. (1993) The origin, distribution, and evolutionary significance of fructans; In: *Science and Technology of Fructans*; Suzuki, M., Chatterton, N.J., Eds.; CRC Press, Boca Raton, FL, p. 119-139
- Hestrin, D., Feingold, D.S., Avigad, G. (1956) The mechanism of polysaccharide production from sucrose. 3. Donor-acceptor specificity of levansucrase from *Aerobacter levanicum*; Biochem. J. 64: 340-351
- Hestrin, S., Avigad, D. (1958) The mechanism of polysaccharide production from sucrose. 5. Transfer of fructose to C-1 of aldose by levansucrase; Biochem. J. 69: 388-398
- Hettwer, U., Gross, M., Rudolph, K. (1995) Purification and characterization of an extracellular Levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola; J. Bacteriol. 177(10): 2834-2839

- Hohmann, C. (2007) Xylitol: Zuckeraustauschstoff gegen Karies; Pharm. Ztg. 38: 48-49
- Holm, F. (2001) Die Gesundheit des Darms; Zusammenfassender Bericht von Fair-Flow Europe über den Einfluss der Prä- und Probiotika auf die Gesundheit;
- Holtkamp, M. (2011) Optimierte Produktgewinnung und Regeneration bei der reaktionsintegrierten Adsorption; Phd. thesis, TU Braunschweig
- Homann, A. (2009) En route to tailor-made oligosaccharides – chemo-enzymatic synthesis and physiological functions of novel carbohydrate structures; Phd. thesis, TU Braunschweig
- Homann, A., Biedendieck, R., Götze, S., Jahn, D., Seibel, J. (2007) Insights into polymer versus oligosaccharide synthesis: mutagenesis and mechanistic studies of a novel levansucrase from *Bacillus megaterium*; Biochem. J. 407(2): 189-198
- Hoshi, S., Sakata, T., Mikuni, K., Hashimoto, H., Kimura, S. (1994) Galactosylsucrose and xylosylfructoside alter digestive tract size and concentrations of cecal organic acids in rats fed diets containing cholesterol and cholic acid; J. Nutri. 124(1): 52-60
- Hsu, C.K., Liao, J.W., Chung, Y.C., Hsieh, C.P., Chan, Y.C. (2004) Xylooligosaccharides and fructooligosaccharides affect the intestinal microbiota and precancerous colonic lesion development in rats; J. Nutr. 134(6): 1523–1528
- Hughes Wassell, D.T., Hall, R.C., Embury, G. (1995) Adsorption of bovine serum albumin onto hydroxyapatite; Biomaterials 16(9): 697-702
- International Union of Biochemistry (1961) Report of the Commission on Enzymes; Pergamon Press, Oxford, UK
- International Union of Biochemistry (1973) IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature: Enzyme nomenclature, Recommendations 1972
- Jagschies, G., O'Hara, A. (2007) Debunking Downstream Bottleneck Myth; In: GEN, 27(14): 62ff.
- Jang, K.H., Song, K.B., Kim, J.S., Kim, C.H., Chung, B.H., Rhee, S.K. (2000) Production of levan using recombinant levansucrase immobilized on hydroxyapatite; Bioproc. Eng. 23(1): 89-93
- Jang, K.H., Song, K.B., Park, B.S., Kim, C.H., Chung, B.H., Choue, R.W., Lee, K.S., Lee, C., Chun, U.H., Rhee, S.K. (2001) Levan production by use of the recombinant levansucrase immobilized on titanium-activated magnetite; Proc. Biochem. 37(4): 339-343
- Jenkins, D.J.A., Kendall, C.W.C., Vuksan, V. (1999) Inulin, oligofructose and intestinal function; J. Nutr., 129(7): 1431-1433

- Jördening, H.-J., Erhardt, F., Ergezinger, M., Berensmeier, S., Bohnet, M., Buchholz, K. (2005) Multiphase fluidized bed reactor for integrated enzymatic production and separation of isomaltose; Carbohydrate Biotechnology Meeting, Barcelona, Spain
- Jordan, D.O. (1955) "The physical properties of nucleic acids"; In: *The Nucleic Acids Vol. 1*; Chargaff, E., Davidson, J.N., eds.; Academic Press, New York, p. 447-492
- Kaname, S. (1982) Production of food or beverage of low tooth decay; Japanese Application Publication; Publication No.: JP 57-186458, Application No.: JP 57-21473; Hayashibara Biochem. Lab. Inc.
- Karlson, P., Doenecke, D., Koolman, J. (1994) Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler; Thieme Verlag, 14. Aufl., Stuttgart [u.a.]
- Kasche, V., Kapone, A., Schwegler, H. (1979) Operational effectiveness factors of immobilized enzyme systems; *Enz. Microb. Technol.* 1(1): 41-46
- Kaur, N., Gupta, A.K. (2002) applications of inulin and oligofructose in health and nutrition; *J. Biosci.* 27(7): 703-714
- Klein, J., Stock, J., Vorlop, K.-D. (1983) Pore size and properties of spherical Ca-alginate biocatalysts; *Eur. J. Appl. Microbiol.* 18: 86-91
- Khanna, S., Parrett, A., Edwards, C.A. (2006) "Non-digestible carbohydrates: nutritional aspects"; In: *Carbohydrates in food, Chapter 8*; Eliasson, A.-C., Eds.; CRC Press, 2nd Edition; Boca Raton FL: Taylor & Francis
- Knežević-Jugović, Z.D., Damnjanović, J.J., Bezbradica, D.I., Mijin, D.Ž. (2008) The immobilization of lipase on sepabeads: coupling, characterization and application in geranyl butyrate synthesis in a low aqueous system; *Chem. Ind. Chem. Eng. Quart.* 14(4): 245-249
- König, S.A.E. (2001) Synthese von neuartigen Fructoseoligosacchariden mit nativer und immobilisierter Levansucrase aus *Zymomonas mobilis*; Phd. thesis, RWTH Aachen
- Kono, T., Yamaguchi, G., Hidaka, H. (1994) Fructose transferring enzyme absorbed on a granular carrier for production of fructooligosaccharides; Meiji Seika Kaisha, Ltd., Tokyo. Japan; United States Patent 5,314,810
- Kresge, C.T., Leonowicz, M.E., Roth, W.J., Vartuli, J.C., Beck, J.S. (1992) Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism; *Nature* 359(6397): 710-712
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4; *Nature* 227: 680-685

- Langmuir, I. (1916) The constitution and fundamental properties of solids and liquids. Part I. solids; J. Am. Chem. Soc. 38(11): 2221-2295
- Lasch, J. (1987) Enzymkinetik: Eine Einführung für Biochemiker, Mediziner, Biologen, Chemiker und Pharmazeuten; Springer Verlag, Berlin [u.a.]
- Laurent, T.C., Fraser, J.R. (1992) Hyaluron; FASEB J. 6(7); 2397-2404
- Lautenschläger, H. (2009) (Poly)Saccharide in Kosmetika – Von A wie Alginat bis Z wie Zuckertensid; Kosmetische Praxis 4: 12-15
- Lee, A., Zumbe, A., Storey, D. (1994) Breath hydrogen after ingestion of the bulk sweeteners sorbitol, isomalt and sucrose in chocolate; Br. J. Nutr. 71(5): 731-737
- Le Gorrec, K., Connes C., Guibert, A., Uribe Larrea, J.-L., Combes, D. (2002) Identification of three inducible and extracellular enzymatic activities working on sucrose in *Bacillus subtilis* NCIMB 11871 and 11872 supernatant; Enz. Microb. Technol. 31(1-2): 44-52
- Leloir, L.F. (1971) Two decades of research on the biosynthesis of saccharides; Sciences 172(3990): 1299-1303
- Lichtenthaler, F.W. (2004) "Carbohydrates as Biofeedstocks for the Chemical Industry"; In: *Green Chemistry Series No. 1* (P. Tundo, Eds.), 3rd Ed., INCA (Interuniversitario Nazionale Chimica Ambiente), Venezia, p. 105-127
- Lichtenthaler, F.W. (2011) "Carbohydrates as Organic Raw Materials"; In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 7th Ed. Release 2011*, p. 35-68
- Lichtenthaler, F.W., Mondel, S. (1997) Perspectives in the use of low molecular weight carbohydrates as organic raw materials; Pure Appl. Chem. 69(9): 1853-1866
- Liese, A., Hilterhaus, L., Howaldt, M., Chmiel, H. (2011) „Enzymkinetik“; In: *Bioprozesstechnik, Kapitel 3*; Chmiel, H., eds., Spektrum Akademischer Verlag, 3. Aufl.; Heidelberg, p. 67-98
- Lindsay, S. (1996) Einführung in die HPLC; Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH; Braunschweig [u.a.]
- Lloyd, K.O., Kabat, E.A., Layug, E.J., Gruezo, F. (1966) Immunochemical studies on blood groups. XXXIV. Structures of some oligosaccharides produced by alkaline degradation of blood groups A, B, and H substances; Biochemistry 5(5): 1489-1501
- Loewenstein, W. (1954) The distribution of aluminium in the tetrahedral of silicates and aluminates; Amer. Mineral. 39: 92-96
- Lyness, E.W., Doelle, H.W. (1983) Levansucrase from *Zymomonas mobilis*; Biotechnol. Lett. 5(5): 345-350

- MacArio, A., Giordano, G., Setti, L., Parise, A., Campelo, J.M., Marinas, J.M., Luna, D. (2007) Study of lipase immobilization on zeolitic support and transesterification reaction in a solvent free-system; *Biocat. Biotrans.* 25(2-4): 328-335
- Macmillan, D., Daines A.M. (2003) Recent developments in the synthesis and discovery of oligosaccharides and glycoconjugates for the treatment of disease; *Curr. Med. Chem.* 10(24): 2733-2773
- Masel, R.I. (1996) Principles of adsorption and reaction on solid surfaces; Wiley-Interscience Verlag, 1. Aufl.; New York, NY [u.a.]
- Mateo, C., Abian, O., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M. (2000) Reversible enzyme immobilization via a very strong and non distorting ionic adsorption on support-polyethylenimine composites; *Biotechnol. Bioeng.* 68(1): 98-105
- Mateo, C., Abian, O., Fernández-Lorente, G., Pessela, B.C.C., Grazu, V., Guisan, J.M., Fernandez-Lafuente, R. (2006) "Immobilization-Stabilization of Enzymes by Multipoint Covalent Attachment on Supports Activated With Epoxy Groups"; In: *Immobilization of Enzymes and Cells, Kapitel 4*; Guisan, J.M., eds.; Humana Press, Totowa, NJ, p. 47-55
- Mateo, C., Palomo, J.M., Fernández-Lorente, G., Guisan, J.M., Fernandez-Lafuente, R. (2007) Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques; *Enz. Microb. Technol.* 40(6): 1451-1463
- McKinsey & Company (2003) Industrial Biotechnology; Studie; www.mckinsey.com
- McNaught, A.D. (1997) Nomenclature of carbohydrates; International Union of Pure and Applied Chemistry and International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Joined commission on biochemical Nomenclature (Recommendations 1996); *Pure Appl. Chem.* 68(10): 1919-2008
- Meier, W.M. (1968) In: *Molecular Sieves*; 1st International Zeolite Conference, Society of Chemical Industry, London, p. 10-27
- Meng, G., Fütterer, K. (2003) Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase; *Nat. Struct. Biol.* 10(11):935-941
- Messing, R.A. (1976) "Adsorption and inorganic bridge formations"; *Methods in Enzymology*, Vol. 44 (Mosbach, K., ed.), Academic Press, New York, p. 148-169
- Michaelis, L., Menten M.L. (1913) Die Kinetik der Invertinwirkung; *Biochem. Z.* 49: 333-369
- Miller, G.L., Blum, R., Glennon, W.E., Burton, A.L. (1960) Measurement of carboxymethylcellulase activity; *Anal. Biochem.* 2: 127-132
- Mosbach, K. (1976) "Immobilized Enzymes, Part A"; *Methods in Enzymology*, Vol. 44, Academic Press, Inc., New York, N.Y., p. 3-999

- Mosbach, K. (1987a) "Immobilized Enzymes and Cells, Part B"; Methods in Enzymology, Vol. 135, Academic Press, inc., Orlando, Florida, p. 3-675
- Mosbach, K. (1987b) "Immobilized Enzymes and Cells, Part C"; Methods in Enzymology, Vol. 136, Academic Press, Inc., Orlando, Florida, p. 3-584
- Mosbach, K. (1988) "Immobilized Enzymes and Cells, Part D"; Methods in Enzymology, Vol. 137, Academic Press, Inc., San Diego, California, p. 3-767
- Nagasawa, T., Yamada, H. (1995) Microbial production of commodity chemicals; Pure Appl. Chem. 67(7): 1241-1256
- Nelson, D.L., Cox, M.M. (2005) Lehninger Biochemie; 3., vollst. überarb. und erw. Aufl., 1. korrigierte Nachdr.; Springer Verlag, Berlin [u.a.]
- Newsam, J.M., Treacy, M.M.J., Koetsier, W.T., Gruyter, C.B.D. (1988) Structural characterization of zeolithe beta; Proc. R. Soc. Lon. A: Mathematical and Physical Sciences 420(1859): 375-405
- Nowikow, K. (1995) Adsorption von Modellproteinen an Bentonit und der Einsatz eines adsorptiven Verfahrens für die Enzymanreicherung aus Zuckerrüben, Phd. thesis, TU Braunschweig
- Oertel, D. (2007) Industrielle stoffliche Nutzung nachwachsender Rohstoffe; Sachstandsbericht zum Monitoring „Nachwachsende Rohstoffe“; TAB-Arbeitsbericht Nr. 114, Berlin
- Ohtsuka, K., Hino, S., Fukushima, T., Ozawa, O., Kanematsu, T., Uchida, T. (1992) Characterization of levansucrase from *Rahnella aquatilis* JCM-1683; Biosci. Biotechn. Biochem. 56(9): 1373-1377
- Parfitt, R.L., Greenland, D.J. (1970) Adsorption of polysaccharides by montmorillonite; Soil Sci. Soc. Am. 34(6): 862-866
- Park, J.K., Chang, H.N. (2000) Microencapsulation of microbial cells; Biotechnol. Adv. 18(4): 303-319
- Park, D., Haam, S., Jang, K., Ahn, I.S., Kim, W.S. (2005) Immobilization of starch-converting enzymes on surface-modified carriers using single and co-immobilized systems: properties and application to starch hydrolysis; Proc. Biochem. 40(1): 53-61
- Pasteur, L. (1861) Sur la fermentation visqueuse et la fermentation butyrique; Bull. Soc. Chimique de Paris; 8 février, p. 30-31
- Peacock, S.D. (1996) Ion exclusion desugarisation of refinery jet 4; Proc. S. Afr. Sug. Technol. Ass. 70: 171-176

- Perez-Oseguera, M.A., Guereca, L., Lopez-Munguia, A. (1996) Properties of Levansucrase from *Bacillus circulans*; Appl. Microbiol. Biotechnol. 45(4): 465-471
- Platková, Z., Polakovič, Štefuca, V., Vandáková, M., Antošová, M. (2006) Selection of carrier for immobilization of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans**; Chem. Pap. 60(6): 469-472
- Pontis, H.G. (1968) Separation of fructosans by gel filtration; Anal. Biochem. 23(2): 331-333
- Pool-Zobel, B. (2005) Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: review of experimental and human data; Br. J. Nutr. 93(1): 73-90
- Pörtner, R. (2006a) "Grundlagen der Bioverfahrenstechnik"; In: *Angewandte Mikrobiologie, Kapitel 13*; Antranikian, G., eds.; Springer Verlag, Berlin [u.a.]; p. 237-251
- Pörtner, R. (2006b) "Fermentation"; In: *Angewandte Mikrobiologie, Kapitel 14*; Antranikian, G., eds.; Springer Verlag, Berlin [u.a.]; p. 253-266
- Přenosil, J.E., Kut, Ö.M., Dunn, I.J., Heinzle, E. (2000) „Biocatalysis, 2. Immobilized Biocatalysts"; In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, B. Elvers et al., eds., Wiley-VCH Verlag, Weinheim
- Prüße, U., Fox, B., Kirchhoff, M., Bruske, F., Breford, J., Vorlop, K.-D. (1998) The jet cutting method as a new immobilization technique; Biotechnol. Tech. 12(2): 105-108
- Puppe, L. (1986) Zeolithe – Eigenschaften und technische Anwendungen; Chemie in unserer Zeit 20(4): 117-127
- Purolite®:
http://www.purolite.com/customized/uploads/pdfs/purolite_corn_sweetener_guide_011807.pdf
- Qian, X., Sujino, K., Palcic, M.M. (2000) "Enzymatic glycosylations with non-natural donors and acceptors"; In: *Carbohydrates in Chemistry and Biology, Vol. 2 Enzymatic synthesis of glycosides and carbohydrate-receptor interaction, Chapter 27*; Ernst, B., Hart, G.W., Sinaý, P., eds.; Wiley-VCH Verlag, Weinheim [u.a.]
- Quirasco, M., Remaud-Simeon, M., Monsan, P., López-Munguia, A. (1999) Experimental behavior of a whole cell immobilized Dextranucrase biocatalyst in batch and packed bed reactors; Bioproc. Bioeng. 20(4): 289-295
- Raftery, M.A., Rand-Meir, T., Dahlquist, F.W., Parsons, S.M., Borders Jr., C.L., Wolcott, R.G., Beranek Jr., W., Jao, L. (1969) Separation of glycosaminoglycan saccharide and glycoside mixtures by gel filtration; Anal. Biochem. 30(3): 427-435

- Rastall, R.A., Hotchkiss A.T. (2003) "Potential for the development of prebiotic oligosaccharides from biomass"; In: *Oligosaccharides in Food and Agriculture, Chapter 4*; G. Eggleston & G.L. Cote, eds.; American Chemical Society, Washington; p. 44-53
- Rathbone, E.B., Hacking, A.J., Cheetham, P.S.J. (1986) Process for the preparation of fructosyl disaccharides; Tate & Lyle Public Limited Company, England; United States Patent 4,617,269
- Rhein, H.-B., Endler, K., Ulber, R., Muffler, K., Müller, F. (2011) Anreize für die Entwicklung und Anwendung umweltfreundlicher biotechnischer Produkte und Verfahren; Umweltforschungsplan des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit; Umweltbundesamt; Herausgeber: Dubbert, W., Fachgebiet III 2.3K Chemische Industrie, Energieerzeugung, Dessau-Roßlau
- Reif, O.-W., Scheper, T. (2006) "Aufreinigung"; In: *Angewandte Mikrobiologie, Kapitel 25*; Antranikian, G., eds.; Springer Verlag, Berlin [u.a.]; p. 427-443
- ResAP(2004)3E (2004) Resolution on ion exchange and adsorbent resins used in the processing of foodstuffs; Adopted by the Committee of Ministers on 1 December 2004 at the 907th meeting of the Ministers' Deputies
- Resindion: Datasheets Sepabeads® EC-EP;
http://www.resindion.com/images/stories/resindion/download/RESINDION_ReliZyme_SepabeadsEC_lug11_web.pdf
http://www.resindion.com/images/stories/resindion/technical/PTDS_SepabeadsEC/PTDS_sepabeadsec_EP.pdf
- Richtlinie 2009/28/EG (2009) Richtlinie zur Förderung der Nutzung von Energien aus erneuerbaren Quellen und zur Änderung und anschließenden Aufhebung der Richtlinien 2001/77/EG und 2003/30/EG; Amtsblatt der Europäischen Union; Richtlinie des Europäischen Parlaments und der Europäischen Union
- Righetti, P.G., Brost, B.C.W., Snyder, R.S. (1981) On the limiting pore size of hydrophilic gels for electrophoresis and isoelectric focusing; *J. Biochem. Biophys. Meth.* 4(5-6): 347-363
- Ringpfeif, M., Pelenc, V., König, J., Petersen, R.-D., Borchert, S. (2007) Verfahren zur enzymatischen Herstellung von Fructosylverbindungen; European Patent Publication; Publication No.: EP 0878549, Application No.: EP 98106603.8; Assignees: Chemisches Laboratorium Dr. Kurt Richter GmbH, Berlin
- Roberfroid, M.B. (1993) Dietary fiber, inulin and oligofructose: a review comparing their physiological effects; *Mutat. Res.* 259: 351-362
- Roberfroid, M.B. (2002) Functional food concept and its application to prebiotics; *Digest. Liver Dis.* 34(2): 105-110
- Roseman, S. (2001) Reflections on glycobiology; *J. Biol. Chem.* 276(45): 41527-41542

- Saling, P. (2008) „CO₂-Bilanz der BASF und Ihrer Produkte“; Ökoeffizienz-Analyse und SEEBALANCE; Auf: *Carbon Footprint von Produkten – Methodik und Kommunikatio*, Presse- und Besucherzentrum, Berlin
- Sawicki, E., Sawicki, C.R. (1976) Aldehydes: Photometric Analysis; Academic Press London, p. 223
- Schomburg, I., Chang, A., Schomburg, D. (2002) BRENDA, enzyme data and metabolic information; *Nucleic Acids Res.* 30(1): 47-49
- Schomburg, I., Hofmann, O., Bänsch, C., Chang, A., Schomburg, D. (2000) Enzyme data and metabolic information: BRENDA, a resource for research in biology, biochemistry, and medicine; *Gene Funct. Dis.* 1(3-4): 109-118
- Schwedt, G. (1994) Chromatographische Trennmethode: theoretische Grundlagen, Techniken und analytische Anwendungen; Thieme Verlag, 3. Aufl., Stuttgart [u.a.]
- Seeberger, P.H., Werz, D.B. (2007) Synthesis and medical applications of oligosaccharides; *Nature* 446(7139): 1046-1051
- Segel, I.H. (1975) Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems; Wiley-Interscience Verlag, New York [u.a.]
- Seibel, J., Moraru, R., Götze, S. (2005) Biocatalytic and chemical investigations in the synthesis of sucrose analogues; *Tetrahedron* 61: 7081-7086
- Seibel, J., Beine, R., Moraru, R., Behringer, C., Buchholz, K. (2006a) A new pathway for the synthesis of oligosaccharides by the use of non-Leloir glycosyltransferases; *Biocat. Biotrans.* 24(1): 157-165
- Seibel, J., Moraru, R., Götze, S., Buchholz, K., Na’amnieh, S., Pawlowski, A., Hecht, H.-J. (2006b) Synthesis of sucrose analogues and the mechanism of action of *Bacillus subtilis* fructosyltransferase (levansucrase); *Carbohydr. Res.* 314(14):2335-2349
- Seibel, J., Jördening, H.-J., Buchholz, K. (2006c) Glycosylation with activated sugars using glycosyltransferases and transglycosidases; *Biocat. Biotrans.* 24 (5): 311-342
- Sharma, S., Yamazaki, H. (1984) Preparation of hydrophobic cotton cloth; *Biotechnol. Lett.* 6(5): 301-306
- Shimizu, Y., Li, B. (2005) "Purification of Water-Soluble Natural Products"; In: *Natural Products Isolation, Chapter 16*; Sarker, S.D., Latif, Z., Gray, A.I., eds, 2nd Edition; Humana Press, Totowa, NJ, p. 415-438
- Smith, J.A., Grove, D., Luenser, S.J., Park, LaGrange (1982) Process for the production of fructose transferase enzyme; CPC International Inc., Englewood Cliffs, N.J.; United States Patent 4,309,505

- Sonnleitner, B., Chmiel, H. (2011) „Wachstum: Kinetik und Prozessführung“; In: *Bioprozesstechnik, Kapitel 4*; Chmiel, H., eds., Spektrum Akademischer Verlag, 3. Aufl.; Heidelberg, p. 99-150
- Stahl, E. (1967) *Dünnschicht-Chromatographie: Ein Laboratoriumshandbuch*; Springer Verlag, 2. Aufl., Berlin [u.a.]
- Steingass, H., Bauer, E., Keller, S. (2006) „Probiotika – Präbiotika – organische Säuren: Alternativen zu antibiotischen Leistungsförderern?“; In: *Proc. 15th Conference on Nutrition of Domestic Animals, Band 15*; Pen, A. (eds.); p. 55-65
- Stewart, W.W., Swaisgood, H.E. (1993) Characterization of calcium alginate pore diameter by size-exclusion chromatography using protein standards; *Enz. Microb. Technol.* 15(11): 922-927
- Strube, C.P. (2011) Structural and functional analysis of the levansucrase SacB from *Bacillus megaterium*; Phd. thesis, TU Braunschweig
- Strube, C.P., Homann, A., Gamer, M., Jahn, D., Seibel, J., Heinz, D.W. (2011) Polysaccharide synthesis of the levansucrase SacB from *Bacillus megaterium* is controlled by distinct surface motifs; *J. Biol. Chem.* 286(20): 17593-17600
- Surmann, P. (1983) Elektrochemische Detektion in der HPLC; *Fresenius Z. Anal. Chem.* 316(4): 373-381
- Sutherland, I.W. (1998) Novel and established applications of microbial polysaccharides; *Trends Biotechnol.* 16(1): 41-46
- Swings, J., DeLey, J. (1977) The biology of *Zymomonas mobilis*; *Bacteriol. Rev.* 41: 1-46
- Szwengiel, A., Czarnecka, M., Czarnecki, Z. (2007) Levan synthesis during associated action of Levansucrase and *Candida cacaoi* DSM 2226 yeast; *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 57(4): 433-440
- Taper, H.S., Roberfroid, M.B. (2000) Nontoxic potentiation of cancer chemotherapy by dietary oligofructose or inulin; *Nutr. Cancer* 38(1): 1-5
- Taylor, R.F. (1991) Protein immobilization: fundamentals and applications; Taylor, R.F., eds.; Marcel Dekker, New York [u.a.]
- Tosa, T., Sato, T., Mori, T., Yamamoto, K., Takata, I., Chibata, I. (1979) Immobilization of enzymes and microbial cells using carrageenan as matrix; *Biotechnol. Bioeng.* 21(10): 1697-1709
- Trénel, G., John, M., Dellweg, H. (1968) Gel chromatography separation of oligosaccharides at elevated temperature; *FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett.* 2(1): 74-76

- Van Bekkum, H., Kouwenhoven, H.W. (1989) The use of zeolites in organic reactions; Recl. Trav. Chim. Pays-Bas, 108(9): 283-294
- Van Hijum, S.A., Szalowska, E., van der Maarel, M.J., Dijkhuizen, L. (2004) Biochemical and molecular characterization of a levansucrase from *Lactobacillus reuteri*; Microbiology 150: 621-630
- Van Hijum, S.A., Kralj, S., Ozimek, L.K., Dijkhuizen, L., Van Geel-Schutten, I.G. (2006) Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria; Microbiol. Mol. Biol. Rev. 70(1): 157-176
- Van Loo, J., Cummings, J., Delzenne, N., Englyst, H., Franck, A., Hopkins, M., Kok, N., Macfarlane, G., Newton, D., Quigley, M.B., Roberfroid, M., van Vliet, T., van den Heuvel, E. (1999) Functional food properties of non- digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project (DGXII AIRII-CT94-1095); Br. J. Nutr. 81(2): 121-132
- Van Tieghem, P. (1878) On sugar-mill gum; Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. 7: 180-203
- Viikari, L. (1988) Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*; Crit. Rev. Biotechnol. 7(3): 237-261
- Vijn, I., Smeekens, S. (1999) Fructan: more than a reserve carbohydrate?; Plant Physiol. 120(2): 351-360
- Voet, D., Voet, J., Pratt, C.W. (2010) Lehrbuch der Biochemie; Wiley-VCH Verlag, 2. Aufl., Weinheim
- Voragen, A.G.J. (1998) Technological aspects of functional food-related carbohydrates; Trends Food Sci. Technol. 9(8-9): 328-335
- Wattenberg, L.W. (1992) Inhibition of carcinogenesis by minor dietary constituents; Cancer Res. 52: 2085-2091
- Weiss, A. (1958) Über das Kationenaustauschvermögen der Tonminerale. II. Der Kationenaustausch bei den Mineralien der Glimmer-, Vermikulit- und Montmorillonitgruppe; Z. anorg. allg. Chemie 297(5/6): 257-286
- Weikamp, J., Puppe, L. (1999) Catalysis and zeolithes: fundamentals and applications; Springer Verlag, Berlin [u.a.]
- Wilson, K., Goulding, K.H. (1991) Methoden der Biochemie; Thieme Verlag, 3. Aufl., Stuttgart [u.a.]
- Woltz, C. (2005) Kinetic studies on alkane hydroisomerization over bifunctional catalysts; Phd. thesis, TU München

- Woodward, J. (1985) "Immobilized enzymes: adsorption and covalent coupling"; In: *Immobilized Cells and Enzymes: A Practical Approach* (Woodward, J., ed.); IRL, Oxford, UK; p. 3-17
- WVZ, VdZ (2011) Weltzuckererzeugung; Wirtschaftliche Vereinigung Zucker e.V. (WVZ), Verein der Zuckerindustrie e.V. (VdZ); <http://www.zuckerverbaende.de>
- Yatka, R.J., Richey, L.C. (1995) Chewing gum containing palatinose and/ or palatinose oligosaccharide; US Patent Publication: Publication No.: US 5399365, Application No.: US 8/167938; Assignees: Wm. Wrigley Jr. Company, Chicago, IL
- Yikrazuul (2010) "Michaelis-Menten_plot.svg"; <http://de.wikipedia.org/wiki/Enzym>
- Yun, J.W. (1996) Fructooligosaccharides – Occurrence, preparation, and application; *Enz. Microb. Technol.* 19(2): 107-117
- Zhang, J., Shao, J., Kowal, P., Wang, P.G. (2003) "Enzymatic Synthesis of Oligosaccharides"; In: *Carbohydrate-based drug discovery, Chapter 6*; Wong, C-H. (eds.); Wiley-VCH Verlag, 1. Aufl., Weinheim [u.a.]; p. 137-168
- Zuccaro, A., Götze, S., Kneip, S., Dersch, P., Seibel, J. (2008) Tailor-made fructooligosaccharides by a combination of substrate and genetic engineering; *Chem. Bio. Chem.* 9(1): 143-149

8. Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

Abkürzungen

1-PEAW	1-Propanol:Ethylacetat:Acetonitril:Wasser
6-APA	6-Aminopenicillansäure
7-ACS	7-Aminocephalosporansäure
ACM	Australian Collection of Microorganisms
AK	Arbeitskreis
Akx	Akzeptorreaktion
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Rinderserum-Albumin
BTM	Biotrockenmasse
CaAc	Calciumacetat
CAZY	Database of Carbohydrate-Active enZymes
DC	Dünnschichtchromatographie
DEAE	Diethylaminoethyl
DEI	Die Ernährungsindustrie
deion.	deionisiert(es) (Wasser)
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DNS	3,5-Dinitrosalicylsäure
D ₂ O	Deuteriumoxid (schweres Wasser)
DSM	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DVB	Divinylbenzol
EC	Enzymkommission der IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) und der IUBMB (international Union of Biochemistry and Molecular Biology)
ESI-MS	Elektronenspray-Ionisierungs-Massenspektrometrie
FAEN	Forschungsverbund Agrar- und Ernährungswissenschaften Niedersachsen
FOS	Fructooligosaccharide
Fru	Fructose
Ftf	Fructosyltransferase
GalA	Galacturonsäure
GalA-Fru	Galacturonsäure-Fructosid
Glu	Glucose
HFCS	High Fructose Corn Sirup

HPAEC	High Pressure Anionic Exchange Chromatography
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
Hyd	Hydrolysereaktion
HZI	Helmholtzzentrum für Infektionsforschung
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranosid
Iso	Isomaltulose
Iso-Fru	Isomaltulose-Fructosid
konz.	konzentrierte
LB	Luria-Bertani
max	maximal(e)
MCM	Mobile Composition of Matter
MW	Mittelwert
NaAc	Natriumacetat
NCIMB	National Collections of Industrial Food and Marine Bacteria
NMR	Nuclear Magnetic Resonanz
OD	Optische Dichte
OS	Oligosaccharid
PAD	gepulste amperometrische Detektion
Poly	Polymerbildung
ResAP	Resolution AP
rpm	Umdrehungen pro Minute
Sac	Saccharose
<i>SacB</i>	Fructosyltransferase aus <i>Bacillus megaterium</i> DSM 319
SFB	Sonderforschungsbereich
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEC	Size-Exclusion Chromatography
<i>Suc1</i>	Fructosyltransferase aus <i>Aspergillus niger</i> AB1.13
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TU	Technische Universität
U	Unit
UDP-	Uridindiphosphat-
VdZ	Verein der Zuckerindustrie e. V.
VWZ	Verweilzeit
WIE	Wasser:Isopropanol:Ethylacetat
WVZ	Wirtschaftliche Vereinigung Zucker e. V.
Xyl	Xylose
Xyl-Fru	Xylosyl-Fructosid

Symbole

Ø	[m]	Durchmesser
A	[U]	Aktivität
A	[1]	präexponentieller Faktor der Arrheniusgleichung
A	[1]	Ausbeute
Å	[10 ⁻¹⁰ m]	Ångström
c	[g L ⁻¹ oder M]	Konzentration
d	[m]	Durchmesser
D _{eff}	[m ² s ⁻¹]	effektiver Diffusionskoeffizient
Da	[1,66018·10 ⁻²⁴ g]	Dalton
E _A	[J mol ⁻¹]	Aktivierungsenergie
F	[1]	Aufreinigungsfaktor
F	[mL s ⁻¹]	Flow
g	[9,81 m s ⁻²]	Erdbeschleunigung
h	[m]	Höhe
k	[M s ⁻¹]	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante
k _{cat}	[s ⁻¹]	Wechselzahl
K'	[1]	Kapazitätsfaktor
K _L	[g g ⁻¹]	Langmuir Koeffizient
K _M	[M]	Michaelis-Menten-Konstante
L	[m]	Länge
m	[g]	Masse
M	[g mol ⁻¹]	Molare Masse
M	[mol mol ⁻¹]	Modul (bei SiO ₂ :Al ₂ O ₃)
n	[1]	Faktor für durchschnittlichen Polymerisationsgrad
n	[mol]	Stoffmenge
P	[g L ⁻¹ oder M]	Produktkonzentration
Pr	[mM mL ⁻¹ min ⁻¹]	Produktivität
pK _a	[1]	Säurekonstante
q*	[g g ⁻¹]	Beladung des Adsorbents
q _{max}	[g g ⁻¹]	maximal adsorbierbare Konzentration des Adsorbents
r	[M s ⁻¹]	Reaktionsrate
R	[1]	Auflösung (bei Chromatogramm)
R	[8,314 J K ⁻¹ mol ⁻¹]	universelle Gaskonstante
R _f	[1]	Retentionsfaktor
S	[g L ⁻¹ oder M]	Substratkonzentration
T	[°C]	Temperatur
t	[h]	Zeit

V_{\max}	[M min ⁻¹]	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
V	[L]	Volumen
\dot{V}	[mL min ⁻¹]	Volumenstrom
X	[1]	Umsatz

Griechische Formelzeichen

α	[1]	Selektivitätsfaktor
λ	[nm]	Wellenlänge
Φ	[1]	Thiele-Modul
η	[1]	Katalysatornutzungsgrad
τ	[h]	mittlere Verweilzeit

Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Aspartat
E	Glu	Glutamat
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Argenin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen	Seite
Abb. 2.1 Markt an nachwachsender Biomasse.....	3
Abb. 2.2 (1) Nucleotidaktivierte Glucose als Substrat für Leloir-Glycosyltransferase und (2) Saccharose als Substrat für Nicht-Leloir-Glycosyltransferase.....	6
Abb. 2.3 Glycosylierung mit Leloir-Glycosyltransferase.....	7
Abb. 2.4 Glycosylierung des Akzeptors mit Fructosyltransferase <i>SacB</i> aus <i>Bacillus megaterium</i>	8
Abb. 2.5 1-Kestose (kürzestes Inulin-Fructan).....	9
Abb. 2.6 6-Kestose (kürzestes Levan-Fructan).....	9
Abb. 2.7 Schematische Darstellung der Polypeptidkette von <i>SacB</i> aus <i>Bacillus megaterium</i> (rot: Signalpeptid; gelb: katalytische Domäne).....	10
Abb. 2.8 Michaelis-Menten-Kinetik einer enzymatischen Reaktion [Yikrazuul, 2010].....	13
Abb. 2.9 pH-Wert-Abhängigkeit einer Enzymreaktion.....	16
Abb. 2.10 Temperaturabhängigkeit einer Enzymreaktion.....	17
Abb. 2.11 Übersicht der Grundverfahren zur Immobilisierung von Biokatalysatoren (B = Biokatalysator; C = Träger) nach [Hartmeier, 1985].....	19
Abb. 2.12 Schema der Gel-Permeations-Chromatographie [Chmiel, 2011].....	26
Abb. 2.13 Chromatogramm und seine Kenngrößen [Chmiel, 2011]. V/t_0 = Totvolumen/-zeit; w = Basisbreite eines Peaks; V_{Ri} = Retentionsvolumen/-zeit der Substanz i ; $V_{R'i}$ = Nettoretentionsvolumen/-zeit der Substanz i ($V_{R'i} = V_{Ri} - V_0$ bzw. $t_{R'i} = t_{Ri} - t_0$).....	27
Abb. 2.14 Quartärstruktur des BEA-Zeoliths [Woltz, 2005].....	30
Abb. 4.1. Plasmid pRBEc1 für Expression der Ftf <i>SacB</i> aus <i>Bacillus megaterium</i> [Biedendieck, 2010].....	37
Abb. 4.2 Reaktion zum Nachweis von Aldosen nach Sawicki und Sawicki (1976).....	42
Abb. 4.3 Precision Plus Protein Unstained Standard (Bio-Rad/ München; Katalog #161-0363).....	44
Abb. 4.4 Strukturformel von Coomassie Brilliant Blue G 250.....	45
Abb. 4.5 Kovalente Bindung von Enzymen an Epoxyträger.....	49
Abb. 4.6 Bindung der Proteine an Hydroxylapatit mit A: basisches Protein; B: saures Protein („Dreieck“-Bindung: kovalente Bindung; „Gepunktete“-Bindung: ionische Bindung; „Doppelklammer“-Bindung: Abstoßung) [Gagnon et al., 2009].....	51
Abb. 4.7 Aufbau der Immobilisierungsapparatur.....	53
Abb. 4.8 DC-Folie zur Analyse der Fraktionen der Säulenchromatographie hinsichtlich des Vorhandensein von Zuckern.....	59
Abb. 4.9 Chromatogramm der Produktlösung mit GalA-Fru (Messung mit HPAEC).....	61
Abb. 4.10 Schematischer Aufbau des kontinuierlichen Systems zur FOS-Produktion.....	65

Abb. 5.1	DC der Akzeptorreaktion mit Isomaltulose (Stationäre Phase: Kieselgel 60F ₂₅₄ ; mobile Phase: WIE im Verhältnis 1:3:6; S = Standard; Reaktionsbedingungen: $c_{\text{Sac}} = 0,3 \text{ M}$, $c_{\text{Iso}} = 0,6 \text{ M}$; 37 °C; pH 6,6; 5 U mL ⁻¹).....	69
Abb. 5.2	DC der Akzeptorreaktion mit Xylose (Stationäre Phase: Kieselgel 60 F ₂₅₄ ; mobile Phase: WIE im Verhältnis 1:3:6; S = Standard; Reaktionsbedingungen: $c_{\text{Sac}} = 0,3 \text{ M}$, $c_{\text{Xyl}} = 0,6 \text{ M}$; 37 °C; pH 6,6; 5 U mL ⁻¹).....	70
Abb. 5.3	Akzeptorreaktion der Ftf mit Saccharose und Galacturonsäure.....	71
Abb. 5.4	DC der Akzeptorreaktion mit Galacturonsäure (Stationäre Phase: Kieselgel 60 F ₂₅₄ ; mobile Phase: 1-PEAW im Verhältnis 25:10:40:25; S1 und S2 = Standards; Reaktionsbedingungen: $c_{\text{Sac}} = 0,3 \text{ M}$, $c_{\text{GalA}} = 0,6 \text{ M}$; 37 °C; pH 6,6; 5 U mL ⁻¹).....	72
Abb. 5.5	Auftrennung der Produktlösung der Akzeptorreaktion mittels HPAEC-PAD (Reaktionsbedingungen: $c_{\text{Sac}} = 0,3 \text{ M}$, $c_{\text{GalA}} = 0,6 \text{ M}$; 37 °C; pH 6,6; 5 U mL ⁻¹).....	72
Abb. 5.6	Aktivität der <i>SacB</i> im Überstand während der kovalenten Bindung an Sepabeads® EC-EP.....	75
Abb. 5.7	Proteingehalt des Überstands während der kovalenten Bindung an Sepabeads® EC-EP.....	76
Abb. 5.8	Adsorptionsisotherme der <i>SacB</i> an Bentonit bzw. Hydroxylapatit.....	78
Abb. 5.9	Aktivitäts-Adsorptionsisotherme der <i>SacB</i> an Bentonit.....	80
Abb. 5.10	Aktivität der an Bentonit adsorbierten <i>SacB</i> nach zwei Waschungen.....	80
Abb. 5.11	Aktivität und Proteingehalt im Überstand (nicht immobilisierte <i>SacB</i>).....	81
Abb. 5.12	SDS-PAGE der Enzymlösung (E) bzw. des Adsorptionsüberstandes (Ü) nach der Adsorption an Bentonit ($c_{\text{eq}} = 0,36 \text{ gProtein g}^{-1} \text{ Bentonit}$) mit M: Precision Plus Protein Unstained Standard (Bio-Rad) (SDS-PAGE: 12 % Trenngel, 4 % Sammelgel).....	82
Abb. 5.13	Herstellung von Bentonit-Alginat-Immobilisaten der <i>SacB</i>	84
Abb. 5.14	Stabilität der Bentonit-Alginat-Immobilisate der Ftf mit A: nach der Herstellung der Perlen und B: nach 5 Tagen Inkubation bei 37 °C in 0,5 M Sac-Lösung.....	84
Abb. 5.15	Kinetisches Reaktionsmodell zur Beschreibung der kinetischen Parameter der Akzeptorreaktion unter Berücksichtigung der Polymerbildung.....	88
Abb. 5.16	Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit <u>nativer <i>SacB</i></u> (Produktbildung, Hydrolyse und Polymerbildung) mit Modell aus 5.3.1. ($c_{\text{Sac}} = 100 \text{ mM}$; $c_{\text{GalA}} = 50 \text{ mM}$; 5,0 U mL ⁻¹ ; T = 37 °C).....	91
Abb. 5.17	Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit <u>nativer <i>SacB</i></u> (Produktbildung, Hydrolyse und Polymerbildung) mit Modell aus 5.3.1. ($c_{\text{Sac}} = 100 \text{ mM}$; $c_{\text{GalA}} = 100 \text{ mM}$; 5,0 U mL ⁻¹ ; T = 37 °C).....	92
Abb. 5.18	Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit <u>nativer <i>SacB</i></u> (Produktbildung, Hydrolyse und Polymerbildung) mit Modell aus 5.3.1. ($c_{\text{Sac}} = 100 \text{ mM}$; $c_{\text{GalA}} = 250 \text{ mM}$; 5,0 U mL ⁻¹ ; T = 37 °C).....	92
Abb. 5.19	Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit <u>nativer <i>SacB</i></u> (Produktbildung, Hydrolyse und Polymerbildung) mit Modell aus 5.3.1. ($c_{\text{Sac}} = 500 \text{ mM}$; $c_{\text{GalA}} = 250 \text{ mM}$; 5,0 U mL ⁻¹ ; T = 37 °C).....	93

Abb. 5.20	Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit <u>adsorbierter SacB</u> (Produktbildung, Hydrolyse und Polymerbildung) mit Modell aus 5.3.1. ($c_{\text{Sac}} = 100 \text{ mM}$; $c_{\text{GalA}} = 100 \text{ mM}$; $5,0 \text{ U mL}^{-1}$; $T = 37 \text{ °C}$)	96
Abb. 5.21	Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit <u>adsorbierter SacB</u> (Produktbildung, Hydrolyse und Polymerbildung) mit Modell aus 5.3.1. ($c_{\text{Sac}} = 100 \text{ mM}$; $c_{\text{GalA}} = 250 \text{ mM}$; $5,0 \text{ U mL}^{-1}$; $T = 37 \text{ °C}$)	97
Abb. 5.22	Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit <u>adsorbierter SacB</u> (Produktbildung, Hydrolyse und Polymerbildung) mit Modell aus 5.3.1. ($c_{\text{Sac}} = 500 \text{ mM}$; $c_{\text{GalA}} = 500 \text{ mM}$; $5,0 \text{ U mL}^{-1}$; $T = 37 \text{ °C}$)	97
Abb. 5.23	Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit <u>adsorbierter SacB</u> (Produktbildung, Hydrolyse und Polymerbildung) mit Modell aus 5.3.1. ($c_{\text{Sac}} = 500 \text{ mM}$; $c_{\text{GalA}} = 750 \text{ mM}$; $5,0 \text{ U mL}^{-1}$; $T = 37 \text{ °C}$)	98
Abb. 5.24	Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit <u>adsorbierter SacB in Alginatperlen</u> (Produktbildung, Hydrolyse und Polymerbildung) mit Modell aus 5.3.1. ($c_{\text{Sac}} = 100 \text{ mM}$; $c_{\text{GalA}} = 50 \text{ mM}$; $5,0 \text{ U mL}^{-1}$; $T = 37 \text{ °C}$)	100
Abb. 5.25	Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit <u>adsorbierter SacB in Alginatperlen</u> (Produktbildung, Hydrolyse und Polymerbildung) mit Modell aus 5.3.1. ($c_{\text{Sac}} = 100 \text{ mM}$; $c_{\text{GalA}} = 100 \text{ mM}$; $5,0 \text{ U mL}^{-1}$; $T = 37 \text{ °C}$)	100
Abb. 5.26	Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit <u>adsorbierter SacB in Alginatperlen</u> (Produktbildung, Hydrolyse und Polymerbildung) mit Modell aus 5.3.1. ($c_{\text{Sac}} = 100 \text{ mM}$; $c_{\text{GalA}} = 250 \text{ mM}$; $5,0 \text{ U mL}^{-1}$; $T = 37 \text{ °C}$)	101
Abb. 5.27	Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit <u>adsorbierter SacB in Alginatperlen</u> (Produktbildung, Hydrolyse und Polymerbildung) mit Modell aus 5.3.1. ($c_{\text{Sac}} = 100 \text{ mM}$; $c_{\text{GalA}} = 500 \text{ mM}$; $5,0 \text{ U mL}^{-1}$; $T = 37 \text{ °C}$)	101
Abb. 5.28	Chromatogramm der Auftrennung des Produktgemisches mit Biogel® P2 (Eluent: $0,1 \text{ M NaAc}$, pH 5,6; Säule: L: 100 cm , $\varnothing 3 \text{ cm}$)	112
Abb. 5.29	Chromatogramm der Auftrennung des Produktgemisches mit Purolite PCR 642 Ca^+ -Form (Eluent: deion. Wasser; Säule: L: 2000 cm , $\varnothing 15 \text{ cm}$)	115
Abb. 5.30	Chromatogramm der Auftrennung des Produktgemisches mit Amberlite CG-120 Na^+ -Form (Eluent: Pufferlösung, pH 4,0; Säule: L: 100 cm , $\varnothing 3 \text{ cm}$)	116
Abb. 5.31	Chromatogramm der Auftrennung des Produktgemisches mit Purolite PCR 642 Ca^+ -Form (Eluent: Pufferlösung, pH 4,0; Säule: L: 100 cm , $\varnothing 3 \text{ cm}$)	117
Abb. 5.32	Chromatographiesäule zur Aufreinigung im größerem Maßstab (Säule: L: 2000 cm – erweiterbar auf 3000 cm , $\varnothing 15 \text{ cm}$; Stationäre Phase: Purolite PCR 642 Ca^+ -Form)	120
Abb. 5.33	Fermentation des GalA-Fru-Produktgemisches mit <i>Zymomonas mobilis</i> ATCC 39676	122
Abb. 5.34	Schematischer Aufbau des kontinuierlich betriebenen Systems zur Produktion von GalA-Fru	126

Abb. 5.35	Umsatz-Simulation der kontinuierlichen Synthese des GalA-Fru im Wirbelschichtreaktor mit Bentonit-Alginat-Immobilisaten für verschiedene Konzentrationsverhältnisse von Donor:Akzeptor ($V_{\text{Reaktionssystem}} = 290 \text{ mL}$).....	128
Abb. 5.36	Ausbeute-Simulation (bezogen auf den Akzeptor GalA) der kontinuierlichen Synthese des GalA-Fru im Wirbelschichtreaktor mit Bentonit-Alginat-Immobilisaten für [Sac]:[GalA] = 100:100, 100:250 und 100:500 ($V_{\text{Reaktionssystem}} = 290 \text{ mL}$).....	129
Abb. 5.37	Simulation der kontinuierlichen Synthese des GalA-Fru im Wirbelschichtreaktor mit Bentonit-Alginat-Immobilisaten bei [Sac]:[GalA] = 500:500 mM ($V_{\text{Reaktionssystem}} = 290 \text{ mL}$).....	130
Abb. 5.38	Versuchsaufbau zur Umsetzung des Reaktorkonzeptes im Labor zur kontinuierlichen Produktion von GalA-Fru mit: P3: Feed-, P4: Produkt- und P1: Rückflussspumpe; Reaktor: $V_{\text{Reaktor}} = 180 \text{ mL}$, $d_{\text{innen}} = 1,6 \text{ cm}$, $d_{\text{außen}} = 3,3 \text{ cm}$, $L = 90 \text{ cm}$; $V_{\text{Reaktionssystem}} = 290 \text{ mL}$	131
Abb. 5.39	Herausheben einzelner Immobilisatverbände aus der Wirbelschicht bei $V_{\text{Perlen}} = 50 \% V_{\text{Reaktor}}$ ($V_{\text{Reaktionssystem}} = 290 \text{ mL}$; Aktivität = $12,2 \text{ U g}^{-1}_{\text{Perlen}}$; $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$; pH 6,6).....	132
Abb. 5.40	Wirbelschicht der Bentonit-Alginat-Immobilisate der <i>SacB</i> ($V_{\text{Reaktionssystem}} = 290 \text{ mL}$; Aktivität = $12,2 \text{ U g}^{-1}_{\text{Perlen}}$; $V_{\text{Perlen}} = 20 \% V_{\text{Reaktor}}$; $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$; pH 6,6).....	133
Abb. 10.1	Kinetisches Reaktionsmodell zur Beschreibung der kinetischen Parameter der Akzeptorreaktion mit Sac und GalA <u>ohne</u> Berücksichtigung der Polymerbildung.....	174
Abb. 10.2	Kinetisches Reaktionsmodell zur Beschreibung der kinetischen Parameter der Akzeptorreaktion mit Sac und GalA <u>unter</u> Berücksichtigung der Polymerbildung.....	175
Abb. 10.3	[Sac]- bzw. [GalA]- Zeit-Kurven der GalA-Fru-Synthese bei: $c_{\text{Sac}} = 100, 500, 100, 500, 100, 500, 100, 500, 750, 1000 \text{ mM}$; $c_{\text{GalA}} = 50, 50, 100, 100, 250, 250, 500, 500, 750, 750 \text{ mM}$; $5,0 \text{ U mL}^{-1}$; $T = 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$; Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit <u>nativer Ftf</u> (Produktbildung und Hydrolyse, <u>keine</u> Polymerbildung).....	175
Abb. 10.4	[GalA-Fru]- bzw. [Glu]- Zeit-Kurven der GalA-Fru-Synthese bei: $c_{\text{Sac}} = 100, 500, 100, 500, 100, 500, 750, 1000 \text{ mM}$; $c_{\text{GalA}} = 50, 50, 100, 100, 250, 250, 500, 500, 750, 750 \text{ mM}$; $5,0 \text{ U mL}^{-1}$; $T = 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$; Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit <u>nativer Ftf</u> (Produktbildung und Hydrolyse, <u>keine</u> Polymerbildung).....	176
Abb. 10.5	[Fru]- Zeit-Kurven der GalA-Fru-Synthese bei: $c_{\text{Sac}} = 100, 500, 100, 500, 100, 500, 100, 500, 750, 1000 \text{ mM}$; $c_{\text{GalA}} = 50, 50, 100, 100, 250, 250, 500, 500, 750, 750 \text{ mM}$; $5,0 \text{ U mL}^{-1}$; $T = 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$; Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit <u>nativer Ftf</u> (Produktbildung und Hydrolyse, <u>keine</u> Polymerbildung)	176
Abb. 10.6	[Sac]- bzw. [GalA]- Zeit-Kurven der GalA-Fru-Synthese bei: $c_{\text{Sac}} = 100, 500, 100, 500, 100, 500, 100, 500, 750, 1000 \text{ mM}$; $c_{\text{GalA}} = 50, 50, 100, 100, 250, 250, 500, 500, 750, 750 \text{ mM}$; $5,0 \text{ U mL}^{-1}$; $T = 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$; Kinetische Modellierung zur	

	Beschreibung der Akzeptorreaktion mit <u>adsorbierter Ftf</u> (Produktbildung und Hydrolyse, <u>keine</u> Polymerbildung)	177
Abb. 10.7	[GalA-Fru]- bzw. [Glu]- Zeit-Kurven der GalA-Fru-Synthese bei: $c_{Sac} = 100, 500, 100, 500, 100, 500, 100, 500, 750, 1000 \text{ mM}$; $c_{GalA} = 50, 50, 100, 100, 250, 250, 500, 500, 750, 750 \text{ mM}$; $5,0 \text{ U mL}^{-1}$; $T = 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$; Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit <u>adsorbierter Ftf</u> (Produktbildung und Hydrolyse, <u>keine</u> Polymerbildung)	177
Abb. 10.8	[Fru]- Zeit-Kurven der GalA-Fru-Synthese bei: $c_{Sac} = 100, 500, 100, 500, 100, 500, 100, 500, 750, 1000 \text{ mM}$; $c_{GalA} = 50, 50, 100, 100, 250, 250, 500, 500, 750, 750 \text{ mM}$; $5,0 \text{ U mL}^{-1}$; $T = 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$; Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit <u>adsorbierter Ftf</u> (Produktbildung und Hydrolyse, <u>keine</u> Polymerbildung)	178
Abb. 10.9	[Sac]- bzw. [GalA]- Zeit-Kurven der GalA-Fru-Synthese bei: $c_{Sac} = 100, 500, 100, 500, 100, 500, 100, 500, 750, 1000 \text{ mM}$; $c_{GalA} = 50, 50, 100, 100, 250, 250, 500, 500, 750, 750 \text{ mM}$; $5,0 \text{ U mL}^{-1}$; $T = 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$; Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit nach Adsorption <u>eingeschlossener Ftf</u> (Produktbildung und Hydrolyse, <u>keine</u> Polymerbildung)	178
Abb. 10.10	[GalA-Fru]- bzw. [Glu]- Zeit-Kurven der GalA-Fru-Synthese bei: $c_{Sac} = 100, 500, 100, 500, 100, 500, 100, 500, 750, 1000 \text{ mM}$; $c_{GalA} = 50, 50, 100, 100, 250, 250, 500, 500, 750, 750 \text{ mM}$; $5,0 \text{ U mL}^{-1}$; $T = 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$; Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit nach Adsorption <u>eingeschlossener Ftf</u> (Produktbildung und Hydrolyse, <u>keine</u> Polymerbildung)	179
Abb. 10.11	[Fru]- Zeit-Kurven der GalA-Fru-Synthese bei: $c_{Sac} = 100, 500, 100, 500, 100, 500, 100, 500, 750, 1000 \text{ mM}$; $c_{GalA} = 50, 50, 100, 100, 250, 250, 500, 500, 750, 750 \text{ mM}$; $5,0 \text{ U mL}^{-1}$; $T = 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$; Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit nach Adsorption <u>eingeschlossener Ftf</u> (Produktbildung und Hydrolyse, <u>keine</u> Polymerbildung)	179
Abb. 10.12	[Sac]- bzw. [GalA]- Zeit-Kurven der GalA-Fru-Synthese bei: $c_{Sac} = 100, 500, 100, 500, 100, 500, 100, 500, 750, 1000 \text{ mM}$; $c_{GalA} = 50, 50, 100, 100, 250, 250, 500, 500, 750, 750 \text{ mM}$; $5,0 \text{ U mL}^{-1}$; $T = 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$; Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit <u>nativer Ftf</u> (Produktbildung, Hydrolyse und Polymerbildung)	180
Abb. 10.13	[GalA-Fru]- bzw. [Glu]- Zeit-Kurven der GalA-Fru-Synthese bei: $c_{Sac} = 100, 500, 100, 500, 100, 500, 100, 500, 750, 1000 \text{ mM}$; $c_{GalA} = 50, 50, 100, 100, 250, 250, 500, 500, 750, 750 \text{ mM}$; $5,0 \text{ U mL}^{-1}$; $T = 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$; Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit <u>nativer Ftf</u> (Produktbildung, Hydrolyse und Polymerbildung)	180
Abb. 10.14	[Fru]- Zeit-Kurven der GalA-Fru-Synthese bei: $c_{Sac} = 100, 500, 100, 500, 100, 500, 100, 500, 750, 1000 \text{ mM}$; $c_{GalA} = 50, 50, 100, 100, 250, 250, 500, 500, 750, 750 \text{ mM}$; $5,0 \text{ U mL}^{-1}$; $T = 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$; Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit <u>nativer Ftf</u> (Produktbildung, Hydrolyse und Polymerbildung)	180

	mM; 5,0 U mL ⁻¹ ; T = 37 °C; Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit <u>nativer Ftf</u> (Produktbildung, Hydrolyse und Polymerbildung).....	181
Abb. 10.15	[Sac]- bzw. [GalA]-Zeit-Kurven der GalA-Fru-Synthese bei: c _{Sac} = 100, 500, 100, 500, 100, 500, 100, 500, 750, 1000 mM; c _{GalA} = 50, 50, 100, 100, 250, 250, 500, 500, 750, 750 mM; 5,0 U mL ⁻¹ ; T = 37 °C; Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit <u>adsorbierter Ftf</u> (Produktbildung, Hydrolyse und Polymerbildung)	181
Abb. 10.16	[GalA-Fru]- bzw. [Glu]-Zeit-Kurven der GalA-Fru-Synthese bei: c _{Sac} = 100, 500, 100, 500, 100, 500, 100, 500, 750, 1000 mM; c _{GalA} = 50, 50, 100, 100, 250, 250, 500, 500, 750, 750 mM; 5,0 U mL ⁻¹ ; T = 37 °C; Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit <u>adsorbierter Ftf</u> (Produktbildung, Hydrolyse und Polymerbildung)	182
Abb. 10.17	[Fru]-Zeit-Kurven der GalA-Fru-Synthese bei: c _{Sac} = 100, 500, 100, 500, 100, 500, 100, 500, 750, 1000 mM; c _{GalA} = 50, 50, 100, 100, 250, 250, 500, 500, 750, 750 mM; 5,0 U mL ⁻¹ ; T = 37 °C; Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit <u>adsorbierter Ftf</u> (Produktbildung, Hydrolyse und Polymerbildung)	182
Abb. 10.18	[Sac]- bzw. [GalA]-Zeit-Kurven der GalA-Fru-Synthese bei: c _{Sac} = 100, 500, 100, 500, 100, 500, 100, 500, 750, 1000 mM; c _{GalA} = 50, 50, 100, 100, 250, 250, 500, 500, 750, 750 mM; 5,0 U mL ⁻¹ ; T = 37 °C; Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit nach Adsorption <u>eingeschlossener Ftf</u> (Produktbildung, Hydrolyse und Polymerbildung)	183
Abb. 10.19	[GalA-Fru]- bzw. [Glu]-Zeit-Kurven der GalA-Fru-Synthese bei: c _{Sac} = 100, 500, 100, 500, 100, 500, 100, 500, 750, 1000 mM; c _{GalA} = 50, 50, 100, 100, 250, 250, 500, 500, 750, 750 mM; 5,0 U mL ⁻¹ ; T = 37 °C; Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit nach Adsorption <u>eingeschlossener Ftf</u> (Produktbildung, Hydrolyse und Polymerbildung)	183
Abb. 10.20	[Fru]-Zeit-Kurven der GalA-Fru-Synthese bei: c _{Sac} = 100, 500, 100, 500, 100, 500, 100, 500, 750, 1000 mM; c _{GalA} = 50, 50, 100, 100, 250, 250, 500, 500, 750, 750 mM; 5,0 U mL ⁻¹ ; T = 37 °C; Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit nach Adsorption <u>eingeschlossener Ftf</u> (Produktbildung, Hydrolyse und Polymerbildung)	184
Abb. 10.21	¹ H Chromatogramm von GalA-Fru	186
Abb. 10.22	¹³ C-CPD Chromatogramm von GalA-Fru	187
Abb. 10.23	¹³ C-Dept135 Chromatogramm von GalA-Fru	188
Abb. 10.24	ESI-MS von GalA-Fru (positiver Ionisierungsmodus).....	189
Abb. 10.25	ESI-MS von GalA-Fru (negativer Ionisierungsmodus).....	190
Abb. 10.26	Pumpenkennlinien der Pumpen P3 und P4.....	191
Abb. 10.27	Pumpenkennlinie der Pumpe P2.....	191

Tabellen	Seite
Tab. 2.1 Porengrößen verschiedener Matrizen	22
Tab. 4.1 Verwendete Bakterienstämme	36
Tab. 4.2 Verwendete bakterielle Plasmide	36
Tab. 4.3 Reaktionsansatz zur Aktivitätsbestimmung: Enzymreaktion	42
Tab. 4.4 Reaktionsansatz zur Aktivitätsbestimmung: DNS-Test	42
Tab. 4.5 Reaktionsansatz für Produktbildungsuntersuchungen	48
Tab. 4.6 Standardrezeptur für die Herstellung von Ca-Alginatperlen	52
Tab. 4.7 Reaktionsansatz zur Aktivitätsbestimmung des eingeschlossenen Enzyms	54
Tab. 4.8 Reaktionsansätze ($V = 20 \text{ mL}$) zur Bestimmung der kinetischen Parameter der nativen Ftf	55
Tab. 4.9 Reaktionsansätze ($V = 20 \text{ mL}$) zur Bestimmung der kinetischen Parameter der adsorbierten Ftf	56
Tab. 4.10 Reaktionsansätze ($V = 20 \text{ mL}$) zur Bestimmung der kinetischen Parameter der Bentonit-Alginat Ftf	56
Tab. 4.11 Untersuchte Adsorber bzw. Zeolithe zur reaktionsintegrierten Produktaufreinigung	58
Tab. 4.12 Verwendeter Laufmittelgradient der HPAEC	60
Tab. 4.13 Parameter der Säulenchromatographie mit Bio-Gel® P2	62
Tab. 4.14 Parameter der Säulenchromatographien mit Anionenaustauschern	63
Tab. 4.15 Parameter der Säulenchromatographien mit Kationenaustauschern	63
Tab. 5.1 Enzympräparationen für das Ftf-Screening	67
Tab. 5.2 Ftf-Screening: Vergleich der Enzymaktivitäten (Substrat: $0,5 \text{ M}$ Saccharose; $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 6,6$)	67
Tab. 5.3 Kinetische Parameter der <u>nativen</u> <i>SacB</i> ; ermittelt durch Modellierungen mit dem in 5.3.1. erstelltem Reaktionsmodell; $R^2 = 0,96721$	95
Tab. 5.4 Kinetische Parameter der <u>adsorbierten</u> <i>SacB</i> ; ermittelt durch Modellierungen mit dem in 5.3.1. erstelltem Reaktionsmodell; $R^2 = 0,94085$	99
Tab. 5.5 Kinetische Parameter der <u>adsorbierten <i>SacB</i> in Alginatperlen</u> ; ermittelt durch Modellierungen mit dem in 5.3.1. erstelltem Reaktionsmodell; $R^2 = 0,91259$	102
Tab. 5.6 Vergleich der kinetischen Parameter der nativen, adsorbierten und Bentonit-Alginat <i>SacB</i>	103
Tab. 5.7 Übersicht der untersuchten Adsorber hinsichtlich ihrer Fähigkeit der Produktadsorption	106
Tab. 5.8 Übersicht der untersuchten Zeolithe hinsichtlich ihrer Fähigkeit der Produktadsorption	109
Tab. 5.9 Vergleich der Trennresultate mit Purolite PCR 642 Ca^+ mit verschiedenen Eluenten	115
Tab. 5.10 Vergleich der unterschiedlichen Austauschmaterialien hinsichtlich deren Potential zur Aufreinigung des GalA-Fru	119

Tab. 5.11	Produktaufreinigung mit <i>Zymomonas mobilis</i> ATCC 39676: Abbaugrade der Zucker [%].....	122
Tab. 10.1	Bestimmung der Biotrockenmassen der Kultivierung von <i>Zymomonas mobilis</i> ATCC 39676 mit ATCC 1731- und abgewandeltem ATCC 1731-Medium.....	174
Tab. 10.2	Vergleich der kinetischen Parameter der beiden verschiedenen Reaktionsmodelle.....	184
Tab. 10.3	Vergleich von D_{eff} , Φ und η der Bentonit-Alginat-Immobilisate der <i>SacB</i> bei verschiedenen Substratkonzentrationen mit $d_{\text{Perle}} = 0,19 \text{ cm}$; $K_M = 2,29 \text{ mM}$; $V_{\text{Akk}} = 0,74 \text{ mM min}^{-1}$	185

10. Anhang

10.1. Mikro- und makromolekulare Grundlagen

10.1.1. Aminosäuresequenz von pRBEc1 [Biedendieck, 2010]

Tccttttcaatattattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaatagg
 ggttccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtctaagaaaccattattatcatgacattaacctataaaaaataggcgtat
 cacgaggcccttctgtctcaagaattctcatgtttgacagcttatcatcgataagctttaatgcggtagttatcacagttaaattgctaa
 cgcagtcaggcaccgtgtatgaaatctaacaatgcgctcatcgtcatcctcgccaccgtcaccctggatgctgtaggcataggctt
 ggttatgccggtactgccgggctcttgcgggatatccggatatagttccttccagcaaaaaacccctcaagaccggttagag
 gccccagggggtatgctagtattgctcagcgggtggcagcagccaactcagcttcttccgggcttggtagcagccggatccgcta
 ttgcaaagcgctcagttctgtctactgttaactgaccttgctcaagaacacgatctttacaacagatgttttgaaccgtcaatgttca
 ctaagaagcttgggtgcaaattgtagagtgggtgtctcataaaagcctctatttgcattgtagcttgaataacgacattatcgctttgtt
 gaggtacagcaaagtgagaatacgtaaatgtttatcattaggatctaaatccatatgaagaactaatcctgtatcatttaaaggctt
 atatttctgttaacgtatttgaacatagcctagcatatacacatcatctgtccgattccatcaatcgctatttagatccgcgagaat
 cgggtaacaagtaccattttccatcttttgaaaatgtttgcacgttcaatttctgtctgaactgtgtttgatgaataagtggcttact
 ttttgagcgtatagtcatttaactcaataatgccaaagccccgttgcataaagaagcttttctttagatccttcaagaagctttt
 tctttcagattggaagaaaggattgttctccgtagtagtctgttatatagagagtcttcacctgatagccatcttctgttctgtgtt
 agcttcgaaaacaaggctacttatgtccgttcttctatgtagtgaggatctcttagcgtatgggtatcccctgtgtcataaccgcctcat
 caataaactgctgaaccgttgataaatcttccgtcaccgtcaaaaattgacttgaatcttctactccatcaactttaacgtattatcg
 tttggctgagacatgttcaactgagctgtcgttaacgtttgtttccgtattgttacctgaataatccgtgtagaacaacgaacttacc
 atctttgttaacgtgccagaaccagaccattctgtgttgattttaagatgcgggtcattcggaacgaatttatcgctgtctttaaca
 ctctccagcgttttccagctgtcaattgattgtctccagctttttatagaaaagataaacagacgtgtcattcgaatctttggatcac
 ctgctagggcaaacacaatttgatatccatgataagtcgctactgttccatcagcattttgtaatggccagctgtcccatacatctaag
 tcaattgtatttctgatgcatttttctttagcagaagcaatgttttaatagtgtattcatcaaaagcagggaactttaactgatcactgt
 tttgctgtgtggaattttccatattatcgcgagtaatatcgaaattccgtagctattattaaagtcttgcgtgtcttcttagccat
 ggtatatctccttctaaagttaaacaattatttctagaggggaattgttatccgctcacaattcccctatagtgcgtattatctt
 gcgggatcgagatctcgatcctctacgcccggacgcacgtggccggcatcaccggcgccacaggtgcgggtgctggcgctata
 tcgccgacatcaccgatggggaagatcgggctcgccacttcgggctcatgagcgttgttccggtgggtatgggtggcaggccc
 cgtggccgggggactgttggcgccatctccttgcattgacaccattccttgcggcggtgctcaacggcctcaacctactactgg
 gctgttctaatgcaggagtcgcataagggagagcgtcgagatcccgacaccatcgaatggcgcaaaaccttgcgggtatg
 gcatgatagcggcggaagagagtcattcagggtgggtgaatgtgaaaccagtaacgttatacagatgtcgcagagtatgccggt
 gtctcttatcagaccgtttccgcgtgggtgaaccaggccagccagcttctgcgaaaacgcgggaaaaagtgggaagcggcgatg
 gcggagctgaattacattcccaaccgcgtggcacaacaactggcgggcaaacagtcgttgcgtgattggcgttgcacctccagtc
 tggccctgcacgcgccgtcgaaattgtcgcggcgattaaatctcgcgccgatcaactgggtgccagcgtgggtgtcgtatggta

gaacgaagcggcgtcgaagcctgtaaagcggcgggtgcacaatcttctcgcgcaacgcgtcagtgggctgatcattaactatccg
ctggatgaccaggatgccattgctgtggaagctgcctgcactaatgtccggcggtatttcttgatgtctctgaccagacacccatcaa
cagtattattttctcccatgaagacggtacgcgactggcggtggagcatctggcgcattgggtcaccagcaaatacgcgctgttagc
gggcccattaagtctgtctcggcgctgtcgctctggctggctggcataaataatctcactcgcaatcaaattcagccgatagcgga
acgggaaggcgactggagtccatgtccggtttcaacaaacatgcaaatactgaatgagggcatcgttccactgcatgctg
gttgccaacgatcagatggcgctggcgcaatgcgcgccattaccgagtcggggctgcgcgttggtgcggtatctcggtagtgg
gatacgacgataccgaagacagctcatgttatatcccgccgttaaccacatcaaacaggattttcgctgctggggcaaaccag
cgtggaccgctgtgcaactctcagggccaggcggtgaagggaatcagctgttggcgtctcactggtgaaaagaaaaac
cacctggcgcccaatacgcaaaccgctctccccgcgctgtggccgattcattaatgcagctggcacgacaggtttccgactg
gaaagcgggcagtgagcgcaacgcaattaatgtaagtttagctcactcattaggcaccgggatctcgaccgatgcccttgagagc
cttcaaccagtcagctcctccgggtggcgcggggcatgactatcgctcgccgacttatgactgtcttcttatcatgcaactcgtag
gacaggtgccggcagcgctctgggtcatttccggcgaggaccgcttgcgtggagcgcgacgatgatcgccctgtcgttgcggtg
ttcggaatcttgacgccctcgctcaagccttcgtcactggtcccgccaccaaacttccggcgagaagcaggccattatcgccgg
catggcgccgacgcgctgggtacgtcttgcgtggcgttcgcgacgcgaggctggatggccttccccattatgattctctcgttcc
ggcgcatcggtatgcccgcttgaggccatgctgtccaggcaggtagatgacgaccatcagggaacagcttcaaggatcgct
cgcggtcttaccagcctaacttcgatcactggaccgctgatcgtcacggcgatttatgccgcctcgggcagcacatggaacggg
ttggcatggattgtaggcgcccctataccttgcgtcctccccgcgttgctgcgcggtgcatggagccggggccacctcgacctga
atggaagccggcgccacctcgctaacggattcaccactccaagaattggagccaatcaattcttgcggagaactgtgaatgcgc
aaaccaacccttggcagaacatatccatcgctccgccatctccagcagccgcacgcggcgcatctcgggcagcgttgggtcct
ggccacgggtgcgcgatgatcgctgctcgttgaggacccggctaggctggcggggttgccttactggttagcagaatgaatca
ccgatacgcgagcgaacgtgaagcgactgctgctgcaaaacgtctgcgacctgagcaacaacatgaatggtcttcggtttccgt
gtttcgtaaagtctgaaacgcggaagtacgcgccctgcaccattatgttccggatctgcatcgaggatgctgctggctaccctgt
ggaacacctacatctgtattaacgaagcgctggcattgacctgagtgattttcttgggtcccgccgatccataccgccagttgtt
accctcacaacgttccagtaaccgggcatgttcatcatcagtaacccgatcgtagcatcctctctcgtttcatcggtatcattacc
ccatgaacagaaatcccccttacacggaggcatcagtgaccaaacaggaaaaaccgcccctaacatggcccgctttatcaga
agccagacattaacgcttctggagaaactcaacgagctggacgcggatgaacaggcagacatctgtgaatcgcttcacgacca
cgctgatgagctttaccgcagctgcctcgcgctttcggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccgagacggtc
acagcttgtctgtaagcggtatccgggagcagacaagcccgtagggcgcgctcagcgggtgttgccgggtgtcggggcgag
ccatgaccagtcacgtagcgatagcggagtgtatactggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgcaccat
atatgcgggtgtaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaaataccgcacatcaggcgcttccgcttctcgtcactgactcgctg
cgctcggtcgttcggctgcggcgagcggatcagctcactcaaaggcggtataacggttatccacagaatcaggggataacgca
ggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcttgctggcggttttccataggctcc
gccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcggt
tccccctggaagctccctcgctgcgtctcgttccgaccctgcgcttaccggatacctgtccgccttctcccttcgggaagcggtg
cgcttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcag
cccgaccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccggtgaagacacgacttatgccactggcagcagccactg

gtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttctgaagtgggtggcctaactacggctacactagaagga
cagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaaccaccgctg
gtagcgggtgggtttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacgggtct
gacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttggtcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaattaaa
aatgaagttttaatcaatctaaagtatatatgagtaaacttggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcg
atctgtctatttcggtcatccatagttgcctgactccccgctgtagataactacgatacgggaggggttaccatctggccccagtgct
gcaatgataccgcgagaccacgctcaccggctccagattatcagcaataaaccagccagccggaagggccgagcgcaga
agtgtctctgcaactttatccgctccatccagctctattaattgttgccgggaagctagagtaagtagttcgcagttaatagttgctg
aacgttgttgcattgctgcaggcatcgtggtgtcacgctcgtcgtttggtatggcttcattcagctccggttccaacgatcaaggcg
agttacatgatccccatgttggtgcaaaaaagcgggttagctccttcggtcctccgatcgtgtcagaagtaagttggccgcagtggtat
cactcatggttatggcagcactgcataattcttactgtcatgccatccgtaagatgctttctgtgactggtgagtactcaaccaagt
cattctgagaatagtgatgcggcgaccgagttgctcttgcggcgctcaacacgggataataccgcgccacatagcagaacttt
aaaagtgtcatcattgaaaacgttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatgaacccac
tcgtgcaccaactgatcttcagcatctttactttaccagcgttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaa
aggaataagggcgacacggaaatgtgaatactcatactct

10.1.2. Aminosäuresequenz von *SacB* aus *Bacillus megaterium* [Biedendieck, 2010]

atgaaatgaaacgagttgctaagcatacaactgctgctacattggctgcagccctactagtaggcgggggatcaaacatttg
ctaaaggaaacgacagcaaaagactttaataatagctacggaatttcgcataattactcgcgataatatggtgaaaattccacagca
gcaaacagtgatcagtttaagttcctgcttttgatgaatcaactattaaaaacattgcttctgctaaaggaaaaaatgcatcagga
aatacaattgacttagatgtatgggacagctggccattacaaaatgctgatggaacagtagcgcacttatcatggatatcaaatgtg
ttgccctagcaggtgatccaaaagattcgaatgacacgtctgtttatctttctataaaaaagctggagacaaatcaattgacagct
ggaaaaacgctggaagagtgttaagacagcgataaattcgttccgaatgacccgcatcttaaaaatcaaacacaagaatggt
ctggttctggcacgtaacaaaagatggtaaagttcgtttgtctacacggattattcaggtaaacaatacggaaaacaaacgtaa
cgacagctcaagtgaacatgtctcagccaaacgataatacgttaaaagttgatggagtagaagattacaagtcaattttgacggt
gacggaaagatttatcaaacggttcagcagtttattgatgaaggcggttatgacacaggggataaccatacgttaagagatcctc
actacatagaagacaacggacataagtacctgttttcgaagctaacacaggaacagaagatggctatcaagggtgaagactctc
tatataacagagcatactacggaggaaacaatccttctccaatctgaaaagaaaaagcttctgaaggatctaataaagaaaa
agcttcttagcaaacggggctttgggcattattgagttaaatgatgactatacgtcaaaaaagtaatgaagccacttattacatca
aacacagttacagacgaaatgaacgtgcaaacattttcaaaaaagatggaaaatggtactgttcaccgattctcgcggtactaa
aatgacgattgatggaatcggaacagatgatgtgtatatgctaggctatgttcaaatacgttaacaggaaaatataagcctttaat
gatacaggattagttctcatatggatttagatcctaataataaaacatttacgtattctcactttgctgtacctcaaaaaaggcgat
aatgtcgttattacaagctacatgacaaatagaggctttatgaagacaaccactctacatttgaccaagcttcttagtgaacattg
acggttcaaaaacatctgttgtaaaagatcgtgttcttgagcaaggctcagttaacagtagacgaagac

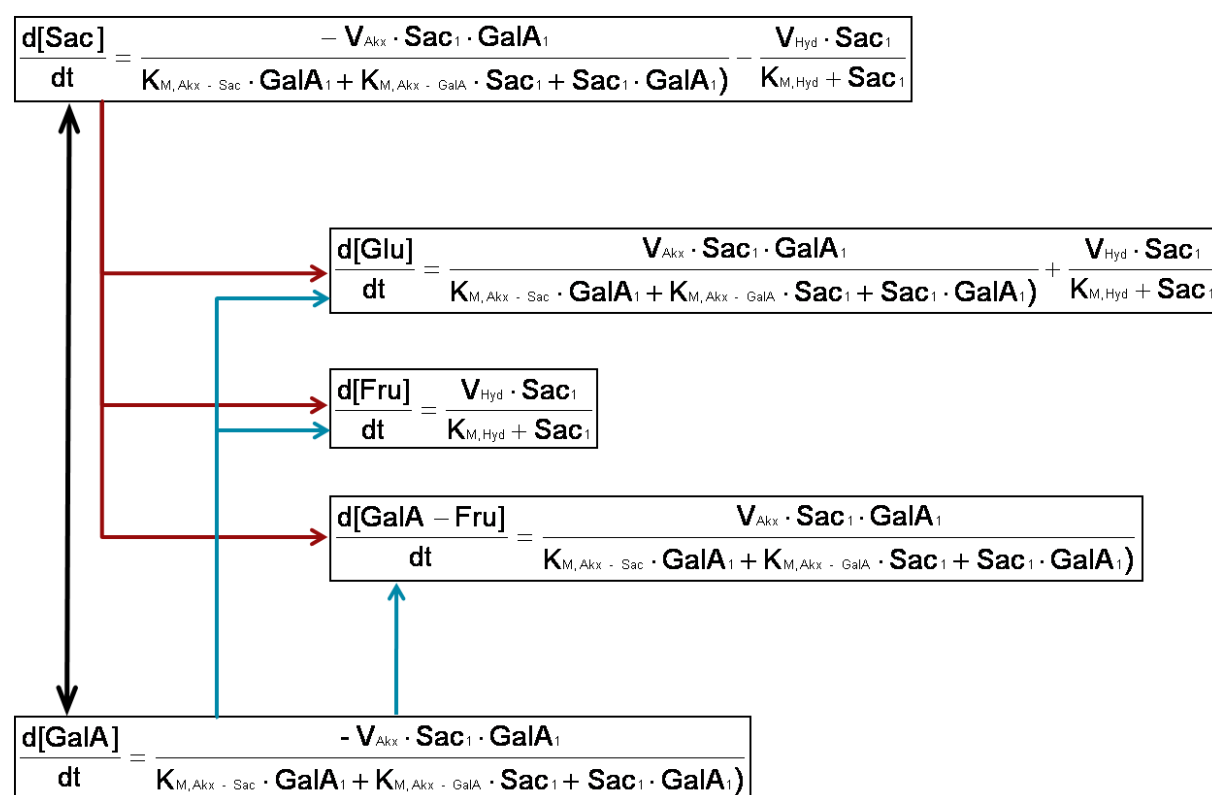
10.1.3. Kultivierung von *Zymomonas mobilis*Tab. 10.1 Bestimmung der Biotrockenmassen der Kultivierung von *Zymomonas mobilis* ATCC 39676 mit ATCC 1731- und abgewandeltem ATCC 1731-Medium

Medium	Nr.	m _{leer} [g]	m _{voll} [g]	Δm [g]	BTM [g L ⁻¹]	MW _{BTM} [g L ⁻¹]
ATCC 1731	1	1,01192	1,01713	0,00521	5,21	5,1725
	2	1,01285	1,01847	0,00562	5,62	
	3	1,01625	1,01833	0,00487	4,87	
	4	1,01346	1,02124	0,00499	4,99	
Abgewandeltes ATCC 1731 nach Crittenden und Playne (2002)	1	1,00404	1,01232	0,00828	8,28	9,1425
	2	1,01302	1,02252	0,0095	9,50	
	3	1,01246	1,02329	0,01083	10,83	
	4	1,01087	1,01883	0,00796	7,96	

10.2. Kinetische Untersuchungen der Fructosyltransferase

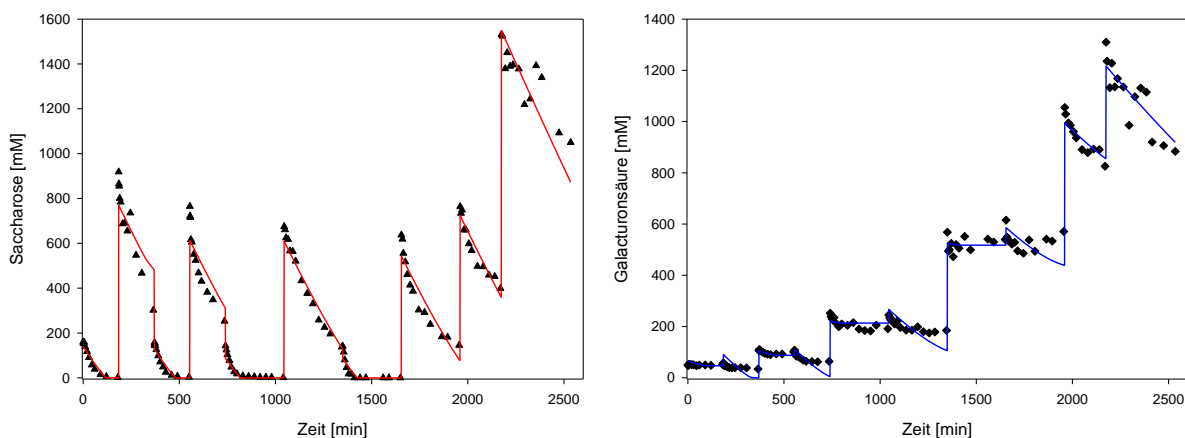
10.2.1. Reaktionsmodell zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit Galacturonsäure

10.2.1.1. Reaktionsmodell OHNE Berücksichtigung der Polymerbildung

Abb. 10.1 Kinetisches Reaktionsmodell zur Beschreibung der kinetischen Parameter der Akzeptorreaktion mit Sac und GalA ohne Berücksichtigung der Polymerbildung

10.2.1.2. Reaktionsmodell MIT Berücksichtigung der Polymerbildung

$$\begin{aligned}
 \frac{d[\text{Sac}]}{dt} &= \frac{-V_{\text{Akx}} \cdot \text{Sac}_1 \cdot \text{GalA}_1}{K_{\text{M,Akx}} \cdot \text{Sac}_1 + K_{\text{M,Akx}} \cdot \text{GalA}_1 + \text{Sac}_1 \cdot \text{GalA}_1} - \frac{V_{\text{Hyd}} \cdot \text{Sac}_1}{K_{\text{M,Hyd}} + \text{Sac}_1} - (n+1) \cdot \frac{V_{\text{Poly}} \cdot \text{Sac}_1}{K_{\text{M,Poly}} + \text{Sac}_1} \\
 \frac{d[\text{Glu}]}{dt} &= \frac{V_{\text{Akx}} \cdot \text{Sac}_1 \cdot \text{GalA}_1}{K_{\text{M,Akx}} \cdot \text{Sac}_1 + K_{\text{M,Akx}} \cdot \text{GalA}_1 + \text{Sac}_1 \cdot \text{GalA}_1} + \frac{V_{\text{Hyd}} \cdot \text{Sac}_1}{K_{\text{M,Hyd}} + \text{Sac}_1} + n \cdot \frac{V_{\text{Poly}} \cdot \text{Sac}_1}{K_{\text{M,Poly}} + \text{Sac}_1} \\
 \frac{d[\text{Fru}]}{dt} &= \frac{V_{\text{Hyd}} \cdot \text{Sac}_1}{K_{\text{M,Hyd}} + \text{Sac}_1} \\
 \frac{d[\text{Polymer}]}{dt} &= (n-1) \cdot \frac{V_{\text{Poly}} \cdot \text{Sac}_1}{K_{\text{M,Poly}} + \text{Sac}_1} \\
 \frac{d[\text{GalA} - \text{Fru}]}{dt} &= \frac{V_{\text{Akx}} \cdot \text{Sac}_1 \cdot \text{GalA}_1}{K_{\text{M,Akx}} \cdot \text{Sac}_1 + K_{\text{M,Akx}} \cdot \text{GalA}_1 + \text{Sac}_1 \cdot \text{GalA}_1} \\
 \frac{d[\text{GalA}]}{dt} &= \frac{-V_{\text{Akx}} \cdot \text{Sac}_1 \cdot \text{GalA}_1}{K_{\text{M,Akx}} \cdot \text{Sac}_1 + K_{\text{M,Akx}} \cdot \text{GalA}_1 + \text{Sac}_1 \cdot \text{GalA}_1}
 \end{aligned}$$

Abb. 10.2 Kinetisches Reaktionsmodell zur Beschreibung der kinetischen Parameter der Akzeptorreaktion mit Sac und GalA unter Berücksichtigung der Polymerbildung10.2.2. Kinetische Modellierungen von Batch-Versuchen ohne Berücksichtigung der Polymerbildung10.2.2.1. Bestimmung der kinetischen Parameter der nativen Fructosyltransferase
 $R^2 = 0,96852$ Abb. 10.3 [Sac]- bzw. [GalA]-Zeit-Kurven der GalA-Fru-Synthese bei: $c_{\text{Sac}} = 100, 500, 100, 500, 100, 500, 100, 500, 750, 1000 \text{ mM}$; $c_{\text{GalA}} = 50, 50, 100, 100, 250, 250, 500, 500, 750, 750 \text{ mM}$; $5,0 \text{ U mL}^{-1}$; $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$; Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit nativer Ftf (Produktbildung und Hydrolyse, keine Polymerbildung)

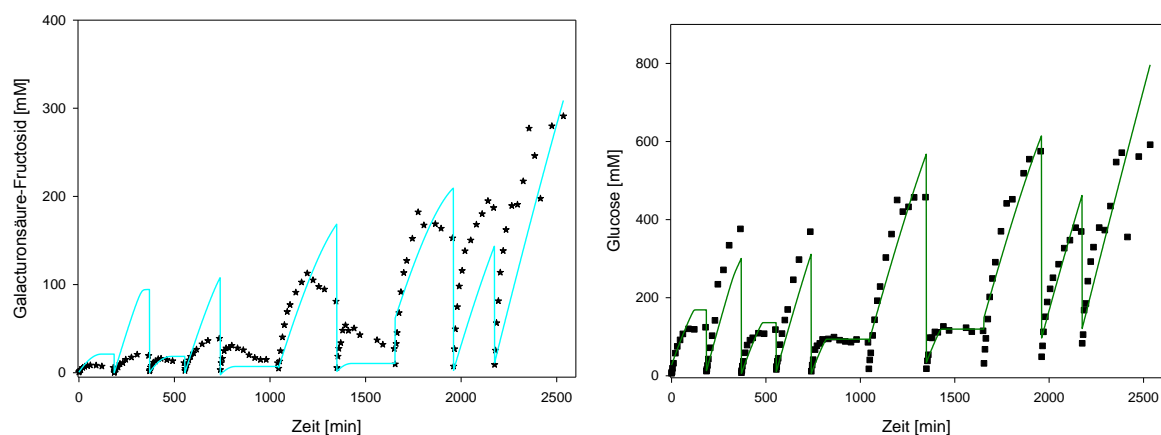


Abb. 10.4 **[Gala-Fru]- bzw. [Glu]-Zeit-Kurven** der GalA-Fru-Synthese bei: $c_{\text{Sac}} = 100, 500, 100, 500, 100, 500, 100, 500, 750, 1000 \text{ mM}$; $c_{\text{GalA}} = 50, 50, 100, 100, 250, 250, 500, 500, 750, 750 \text{ mM}$; $5,0 \text{ U mL}^{-1}$; $T = 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$; Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit nativer Ftf (Produktbildung und Hydrolyse, keine Polymerbildung)

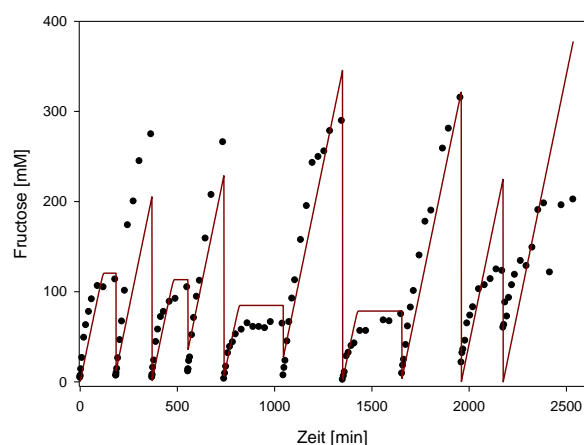


Abb. 10.5 **[Fru]-Zeit-Kurven** der GalA-Fru-Synthese bei: $c_{\text{Sac}} = 100, 500, 100, 500, 100, 500, 100, 500, 750, 1000 \text{ mM}$; $c_{\text{GalA}} = 50, 50, 100, 100, 250, 250, 500, 500, 750, 750 \text{ mM}$; $5,0 \text{ U mL}^{-1}$; $T = 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$; Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit nativer Ftf (Produktbildung und Hydrolyse, keine Polymerbildung)

10.2.2.2. Bestimmung der kinetischen Parameter der adsorbierten Fructosyltransferase

$$R^2 = 0,93487$$

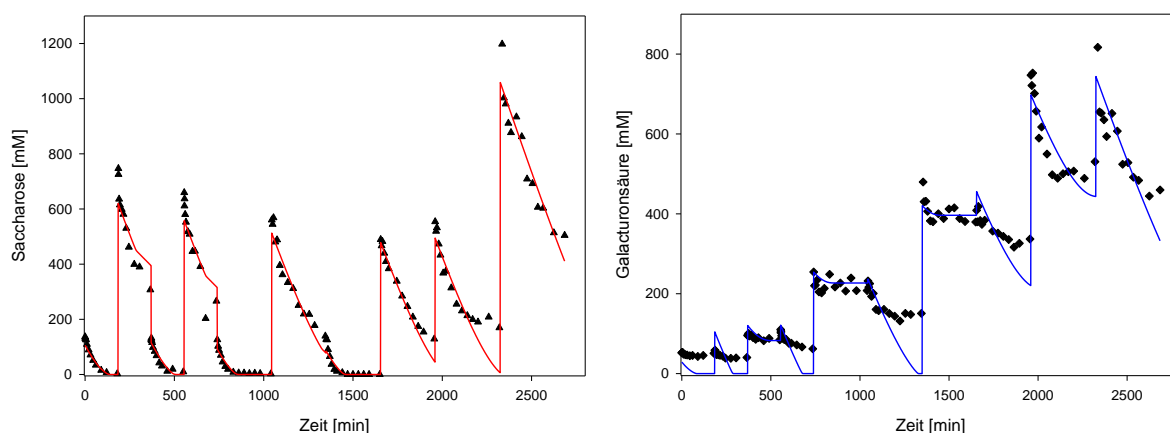


Abb. 10.6 **[Sac]- bzw. [GalA]-Zeit-Kurven** der GalA-Fru-Synthese bei: $c_{\text{Sac}} = 100, 500, 100, 500, 100, 500, 750, 1000 \text{ mM}$; $c_{\text{GalA}} = 50, 50, 100, 100, 250, 250, 500, 500, 750, 750 \text{ mM}$; $5,0 \text{ U mL}^{-1}$; $T = 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$; Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit adsorbierter Ftf (Produktbildung und Hydrolyse, keine Polymerbildung)

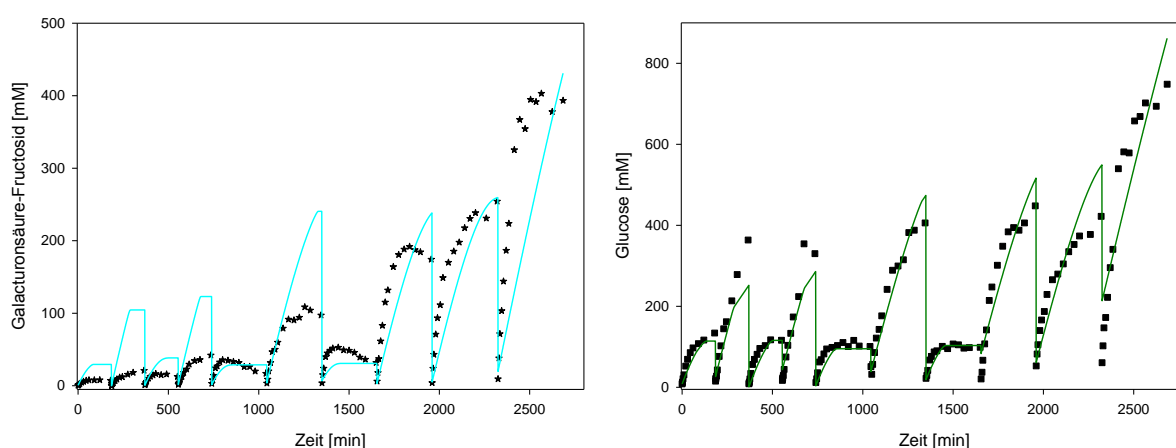


Abb. 10.7 **[GalA-Fru]- bzw. [Glu]-Zeit-Kurven** der GalA-Fru-Synthese bei: $c_{\text{Sac}} = 100, 500, 100, 500, 100, 500, 100, 500, 750, 1000 \text{ mM}$; $c_{\text{GalA}} = 50, 50, 100, 100, 250, 250, 500, 500, 750, 750 \text{ mM}$; $5,0 \text{ U mL}^{-1}$; $T = 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$; Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit adsorbierter Ftf (Produktbildung und Hydrolyse, keine Polymerbildung)

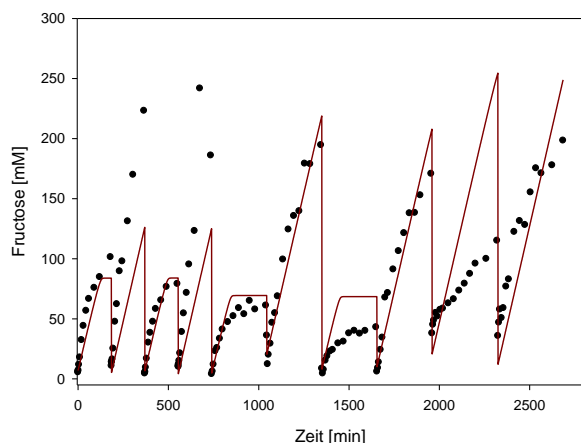


Abb. 10.8 **[Fru]**-Zeit-Kurven der GalA-Fru-Synthese bei: $c_{\text{Sac}} = 100, 500, 100, 500, 100, 500, 100, 500, 750, 1000 \text{ mM}$; $c_{\text{GalA}} = 50, 50, 100, 100, 250, 250, 500, 500, 750, 750 \text{ mM}$; $5,0 \text{ U mL}^{-1}$; $T = 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$; Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit adsorbierter Ftf (Produktbildung und Hydrolyse, keine Polymerbildung)

10.2.2.3. Bestimmung der kinetischen Parameter der nach Adsorption in Alginat eingeschlossener Fructosyltransferase; $R^2 = 0,85437$

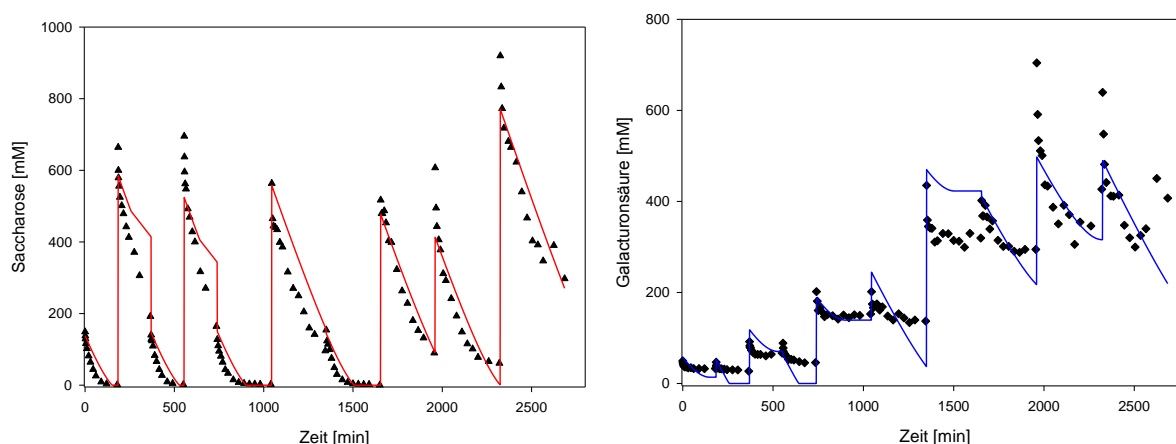


Abb. 10.9 **[Sac]**- bzw. **[GalA]**-Zeit-Kurven der GalA-Fru-Synthese bei: $c_{\text{Sac}} = 100, 500, 100, 500, 100, 500, 100, 500, 750, 1000 \text{ mM}$; $c_{\text{GalA}} = 50, 50, 100, 100, 250, 250, 500, 500, 750, 750 \text{ mM}$; $5,0 \text{ U mL}^{-1}$; $T = 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$; Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit nach Adsorption eingeschlossener Ftf (Produktbildung und Hydrolyse, keine Polymerbildung)

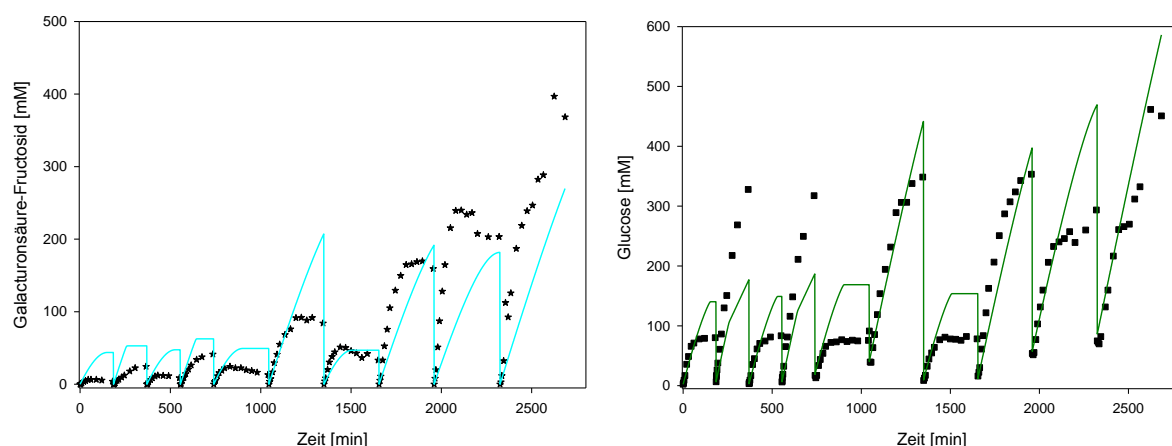


Abb. 10.10 **[GalA-Fru]-** bzw. **[Glu]-**Zeit-Kurven der GalA-Fru-Synthese bei: $c_{\text{Sac}} = 100, 500, 100, 500, 100, 500, 100, 500, 750, 1000 \text{ mM}$; $c_{\text{GalA}} = 50, 50, 100, 100, 250, 250, 500, 500, 750, 750 \text{ mM}$; $5,0 \text{ U mL}^{-1}$; $T = 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$; Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit nach Adsorption eingeschlossener Ftf (Produktbildung und Hydrolyse, keine Polymerbildung)

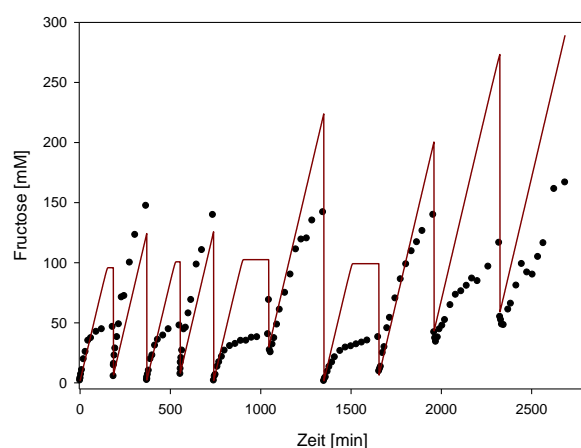


Abb. 10.11 **[Fru]-**Zeit-Kurven der GalA-Fru-Synthese bei: $c_{\text{Sac}} = 100, 500, 100, 500, 100, 500, 100, 500, 750, 1000 \text{ mM}$; $c_{\text{GalA}} = 50, 50, 100, 100, 250, 250, 500, 500, 750, 750 \text{ mM}$; $5,0 \text{ U mL}^{-1}$; $T = 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$; Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit nach Adsorption eingeschlossener Ftf (Produktbildung und Hydrolyse, keine Polymerbildung)

10.2.3. Kinetische Modellierungen von Batch-Versuchen unter Berücksichtigung der Polymerbildung

10.2.3.1. Bestimmung der kinetischen Parameter der nativen Fructosyltransferase $R^2 = 0,96721$

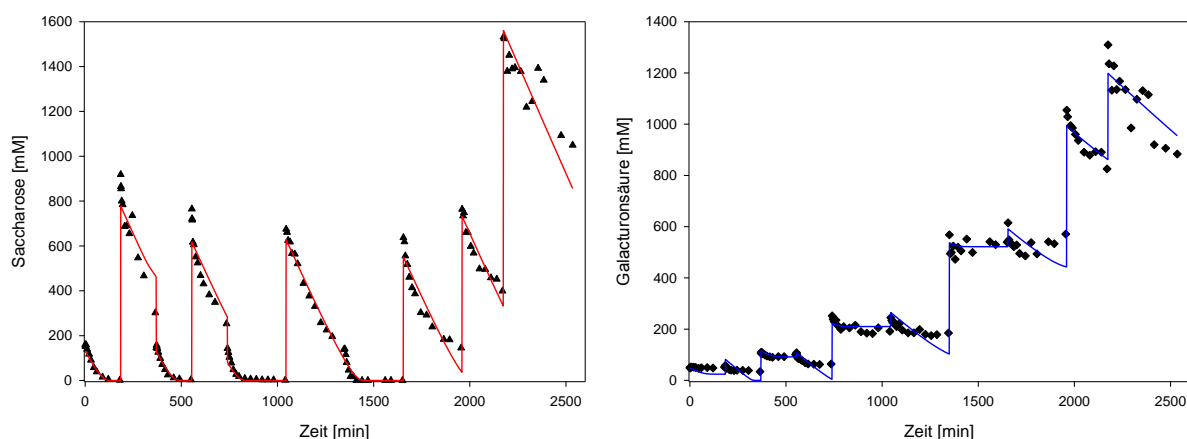


Abb. 10.12 **[Sac]- bzw. [GalA]-Zeit-Kurven** der GalA-Fru-Synthese bei: $c_{\text{Sac}} = 100, 500, 100, 500, 100, 500, 100, 500, 750, 1000 \text{ mM}$; $c_{\text{GalA}} = 50, 50, 100, 100, 250, 250, 500, 500, 750, 750 \text{ mM}$; $5,0 \text{ U mL}^{-1}$; $T = 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$; Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit nativer Ftf (Produktbildung, Hydrolyse und Polymerbildung)

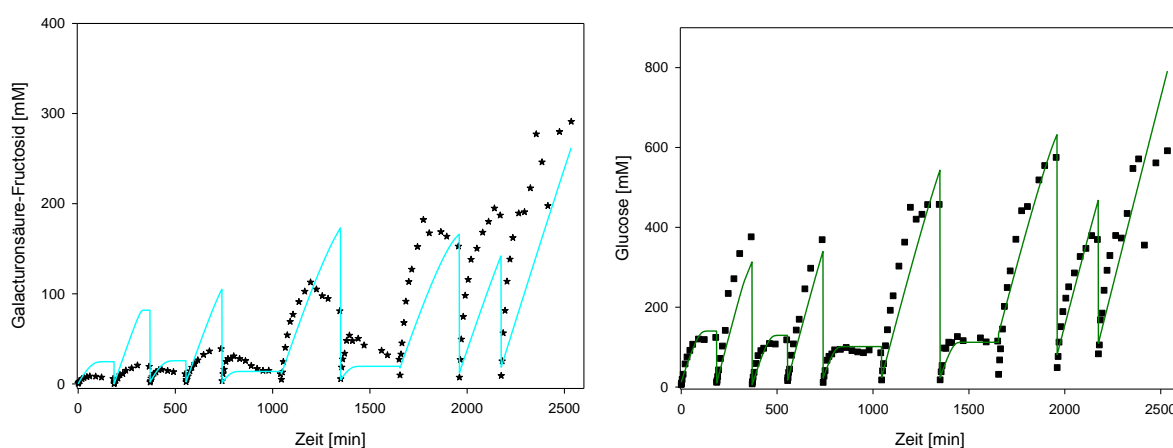


Abb. 10.13 **[GalA-Fru]- bzw. [Glu]-Zeit-Kurven** der GalA-Fru-Synthese bei: $c_{\text{Sac}} = 100, 500, 100, 500, 100, 500, 100, 500, 750, 1000 \text{ mM}$; $c_{\text{GalA}} = 50, 50, 100, 100, 250, 250, 500, 500, 750, 750 \text{ mM}$; $5,0 \text{ U mL}^{-1}$; $T = 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$; Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit nativer Ftf (Produktbildung, Hydrolyse und Polymerbildung)

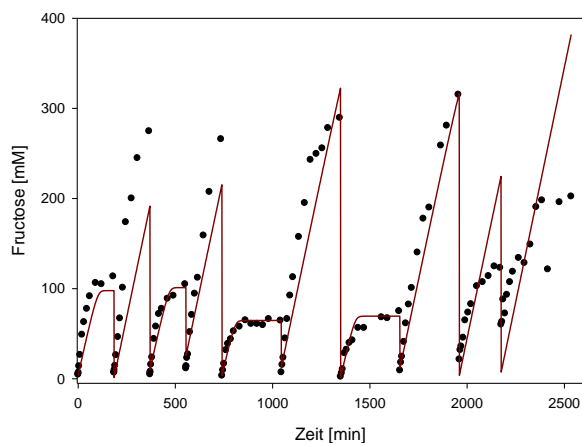


Abb. 10.14 **[Fru]**-Zeit-Kurven der GalA-Fru-Synthese bei: $c_{\text{Sac}} = 100, 500, 100, 500, 100, 500, 100, 500, 750, 1000 \text{ mM}$; $c_{\text{GalA}} = 50, 50, 100, 100, 250, 250, 500, 500, 750, 750 \text{ mM}$; $5,0 \text{ U mL}^{-1}$; $T = 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$; Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit nativer Ftf (Produktbildung, Hydrolyse und Polymerbildung)

10.2.3.2. Bestimmung der kinetischen Parameter der adsorbierten Fructosyltransferase $R^2 = 0,94085$

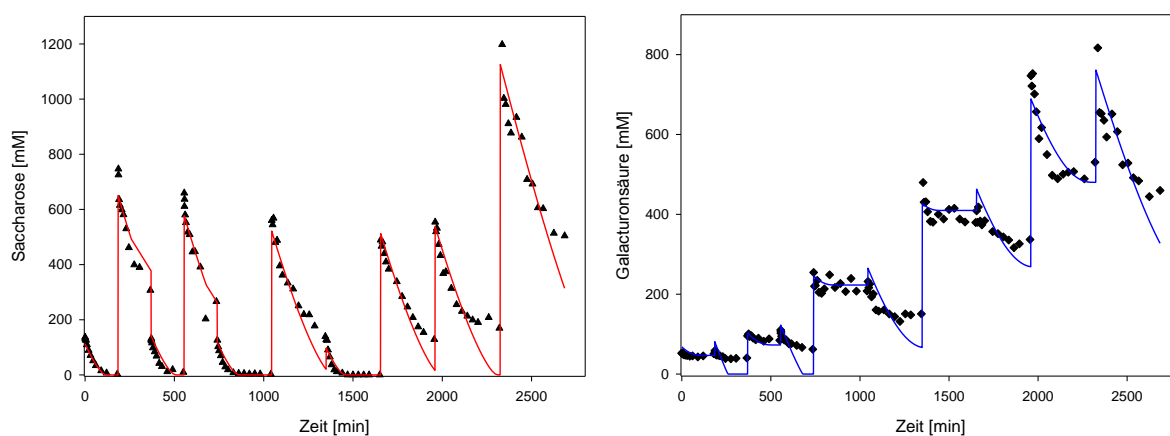


Abb. 10.15 **[Sac]**- bzw. **[GalA]**-Zeit-Kurven der GalA-Fru-Synthese bei: $c_{\text{Sac}} = 100, 500, 100, 500, 100, 500, 100, 500, 750, 1000 \text{ mM}$; $c_{\text{GalA}} = 50, 50, 100, 100, 250, 250, 500, 500, 750, 750 \text{ mM}$; $5,0 \text{ U mL}^{-1}$; $T = 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$; Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit adsorbierter Ftf (Produktbildung, Hydrolyse und Polymerbildung)

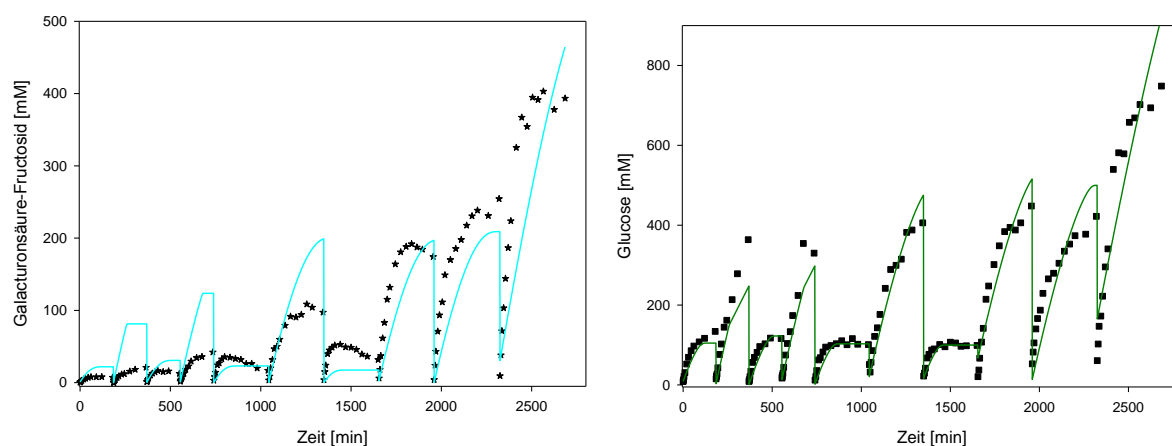


Abb. 10.16 **[Gala-Fru]-** bzw. **[Glu]-**Zeit-Kurven der GalA-Fru-Synthese bei: $c_{\text{Sac}} = 100, 500, 100, 500, 100, 500, 100, 500, 750, 1000 \text{ mM}$; $c_{\text{GalA}} = 50, 50, 100, 100, 250, 250, 500, 500, 750, 750 \text{ mM}$; $5,0 \text{ U mL}^{-1}$; $T = 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$; Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit adsorbierter Ftf (Produktbildung, Hydrolyse und Polymerbildung)

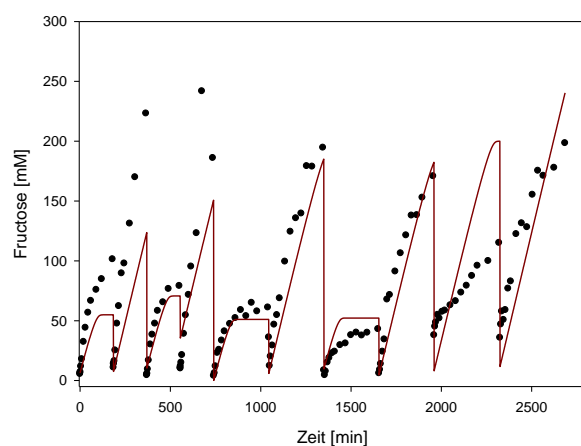


Abb. 10.17 **[Fru]-**Zeit-Kurven der GalA-Fru-Synthese bei: $c_{\text{Sac}} = 100, 500, 100, 500, 100, 500, 100, 500, 750, 1000 \text{ mM}$; $c_{\text{GalA}} = 50, 50, 100, 100, 250, 250, 500, 500, 750, 750 \text{ mM}$; $5,0 \text{ U mL}^{-1}$; $T = 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$; Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit adsorbierter Ftf (Produktbildung, Hydrolyse und Polymerbildung)

10.2.3.3. Bestimmung der kinetischen Parameter der nach Adsorption in Alginat eingeschlossener Fructosyltransferase; $R^2 = 0,91259$

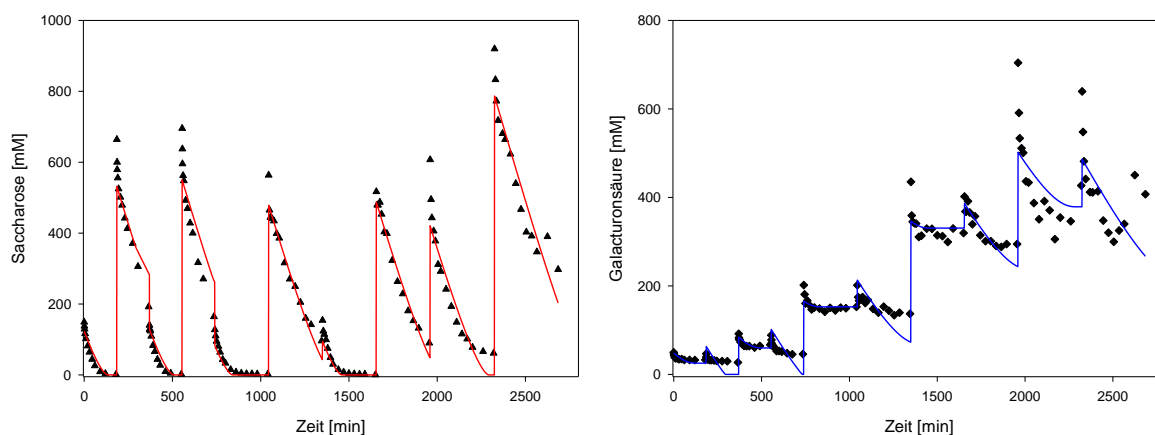


Abb. 10.18 **[Sac]- bzw. [GalA]-Zeit-Kurven** der GalA-Fru-Synthese bei: $c_{\text{Sac}} = 100, 500, 100, 500, 100, 500, 100, 500, 750, 1000 \text{ mM}$; $c_{\text{GalA}} = 50, 50, 100, 100, 250, 250, 500, 500, 750, 750 \text{ mM}$; $5,0 \text{ U mL}^{-1}$; $T = 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$; Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit nach Adsorption eingeschlossener Ftf (Produktbildung, Hydrolyse und Polymerbildung)

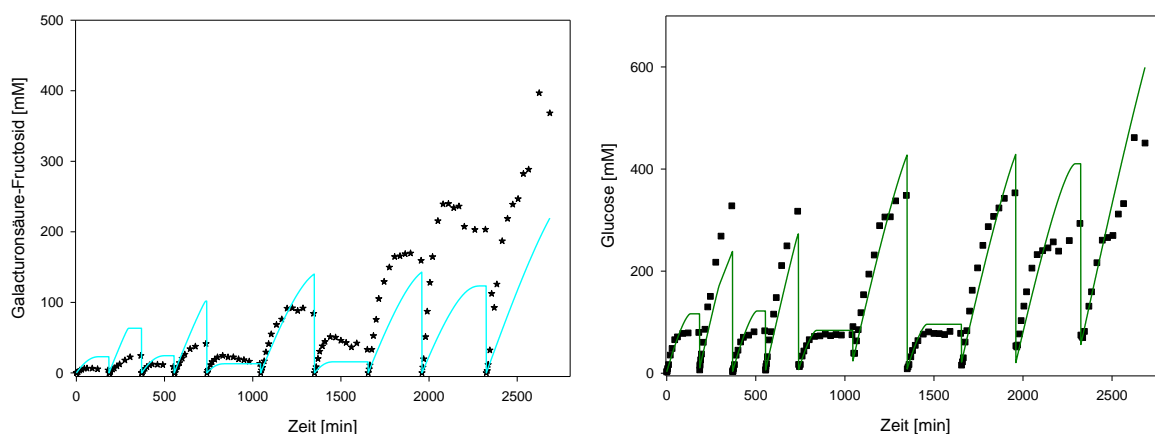


Abb. 10.19 **[GalA-Fru]- bzw. [Glu]-Zeit-Kurven** der GalA-Fru-Synthese bei: $c_{\text{Sac}} = 100, 500, 100, 500, 100, 500, 100, 500, 750, 1000 \text{ mM}$; $c_{\text{GalA}} = 50, 50, 100, 100, 250, 250, 500, 500, 750, 750 \text{ mM}$; $5,0 \text{ U mL}^{-1}$; $T = 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$; Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit nach Adsorption eingeschlossener Ftf (Produktbildung, Hydrolyse und Polymerbildung)

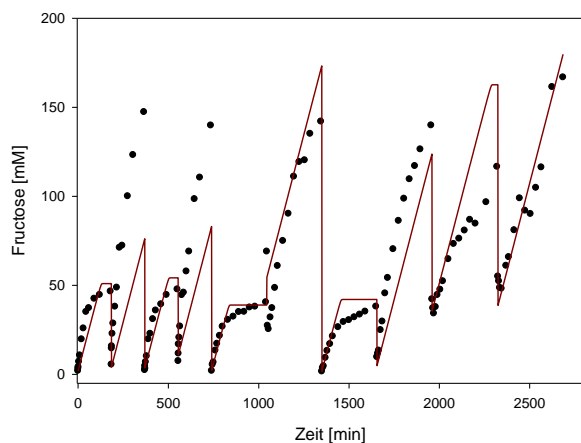


Abb. 10.20 **[Fru]**-Zeit-Kurven der GalA-Fru-Synthese bei: $c_{\text{Sac}} = 100, 500, 100, 500, 100, 500, 100, 500, 750, 1000 \text{ mM}$; $c_{\text{GalA}} = 50, 50, 100, 250, 250, 500, 500, 750, 750 \text{ mM}$; $5,0 \text{ U mL}^{-1}$; $T = 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$; Kinetische Modellierung zur Beschreibung der Akzeptorreaktion mit nach Adsorption eingeschlossener Ftf (Produktbildung, Hydrolyse und Polymerbildung)

10.2.4. Vergleich der kinetischen Parameter der beiden Reaktionsmodelle

Tab. 10.2 Vergleich der kinetischen Parameter der beiden verschiedenen Reaktionsmodelle

Parameter	Native Ftf		Adsorbierte Ftf		Bentonit-Alginat Ftf	
	ohne	mit	ohne	mit	ohne	mit
	Berücksichtigung der Polymerbildung im Reaktionsmodell					
$K_{\text{M, Akx-Sac}} [\text{mM}]$	307,0299	111,2273	170,4131	426,9478	114,5343	169,7970
$K_{\text{M, Akx-GalA}} [\text{mM}]$	3,295680	2,282573	1,601014	1,470110	0,821722	0,945811
$K_{\text{M, Hyd}} [\text{mM}]$	1,208901	8,325371	2,319735	14,06463	0,683138	0,561639
$K_{\text{M, Poly}} [\text{mM}]$	-	49,34898	-	2,440966	-	21,05710
$n [1]$	-	2,750537	-	1,634718	-	4,462573
$V_{\text{Akx}} [\text{mM min}^{-1}]$	1,044121	0,741591	1,428490	1,998004	0,929423	0,848202
$V_{\text{Hyd}} [\text{mM min}^{-1}]$	1,050416	1,048096	0,659675	0,649433	0,639997	0,392058
$V_{\text{Poly}} [\text{mM min}^{-1}]$	-	0,066854	-	0,157361	-	0,119137
R^2	0,96852	0,96721	0,93487	0,94085	0,85437	0,91259

10.2.5. Ermittlung des effektiven Diffusionskoeffizienten, Thiele-Modul und Katalysatorwirkungsgrads der Bentonit-Alginat-Immobilisate der *SacB* bei verschiedenen Substratkonzentrationen

Tab. 10.3 Vergleich von D_{eff} , Φ und η der Bentonit-Alginat-Immobilisate der *SacB* bei verschiedenen Substratkonzentrationen mit $d_{\text{Perle}} = 0,19 \text{ cm}$; $K_M = 2,29 \text{ mM}$; $V_{A_{Kx}} = 0,74 \text{ mM min}^{-1}$

Sac [mM]	$D_{\text{eff}} [\text{cm}^2 \text{ min}^{-1}]$	$\Phi [1]$	$\eta [1]$
100	$2,77142 \cdot 10^{-5}$	3,42863105	0,62162786
500	$9,23750 \cdot 10^{-6}$	5,93874900	0,42010300
1000	$1,40559 \cdot 10^{-6}$	6,21538190	0,40501944

10.3. Aufreinigung und Analyse der neuartigen Produkte

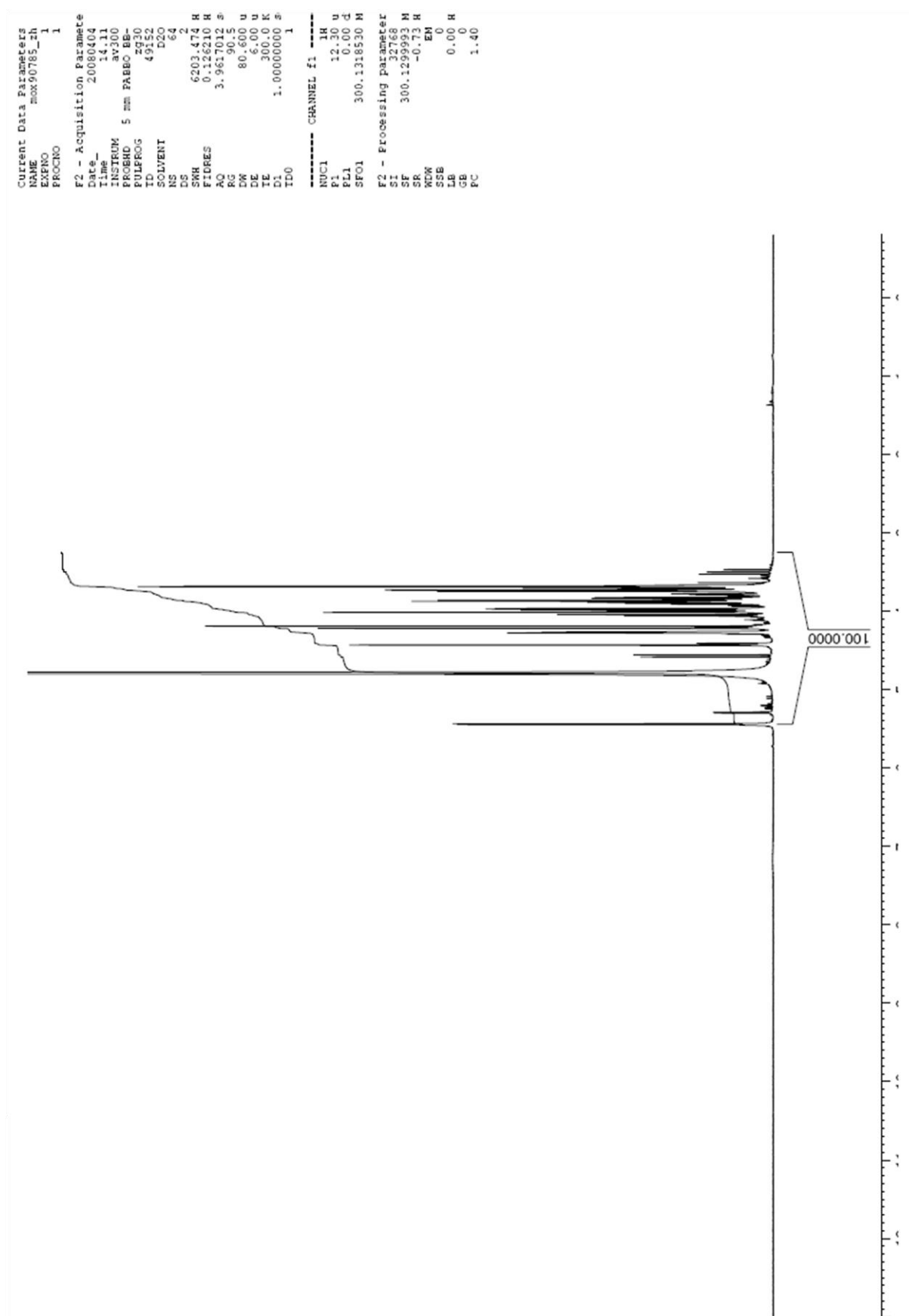


Abb. 10.21 ^1H Chromatogramm von GalA-Fru

```

Current Data Parameters
NAME      mos0705_2
EXPNO     2
PROCNO    1

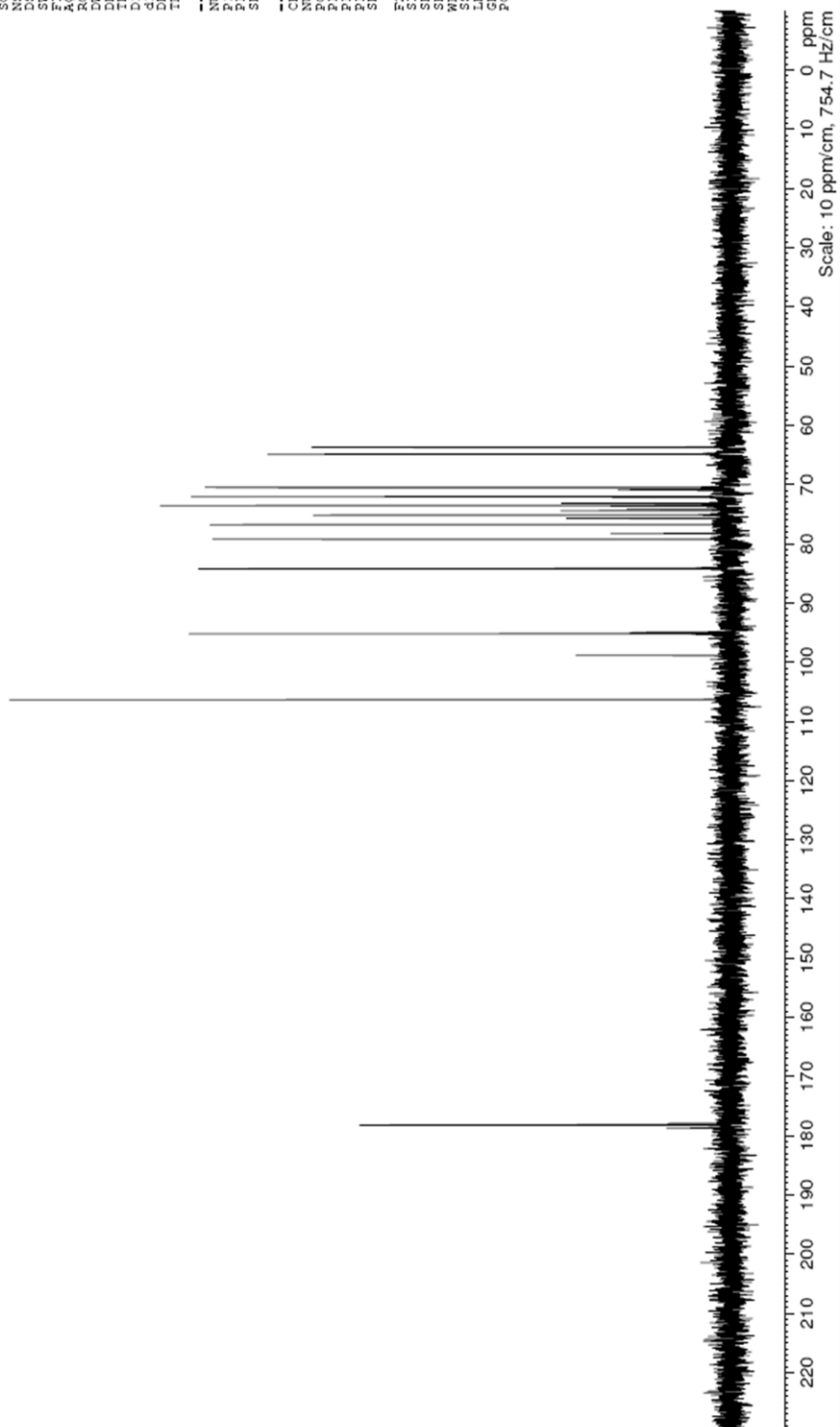
F2 - Acquisition Parameters
Date_     20080404
Time      14.00
INSTRUM   zgpg30
PROBHD    5 mm PABBO BB-
PULPROG   zgpg30
TD        65536
FIDRES    0.200774
AQ        2.4904180
RG        25.575
DW        25.333
DE        6.00
TE        300.2
D1         2.0000000
d11        0.0300000
DELTA     1.8999998
TD0        1

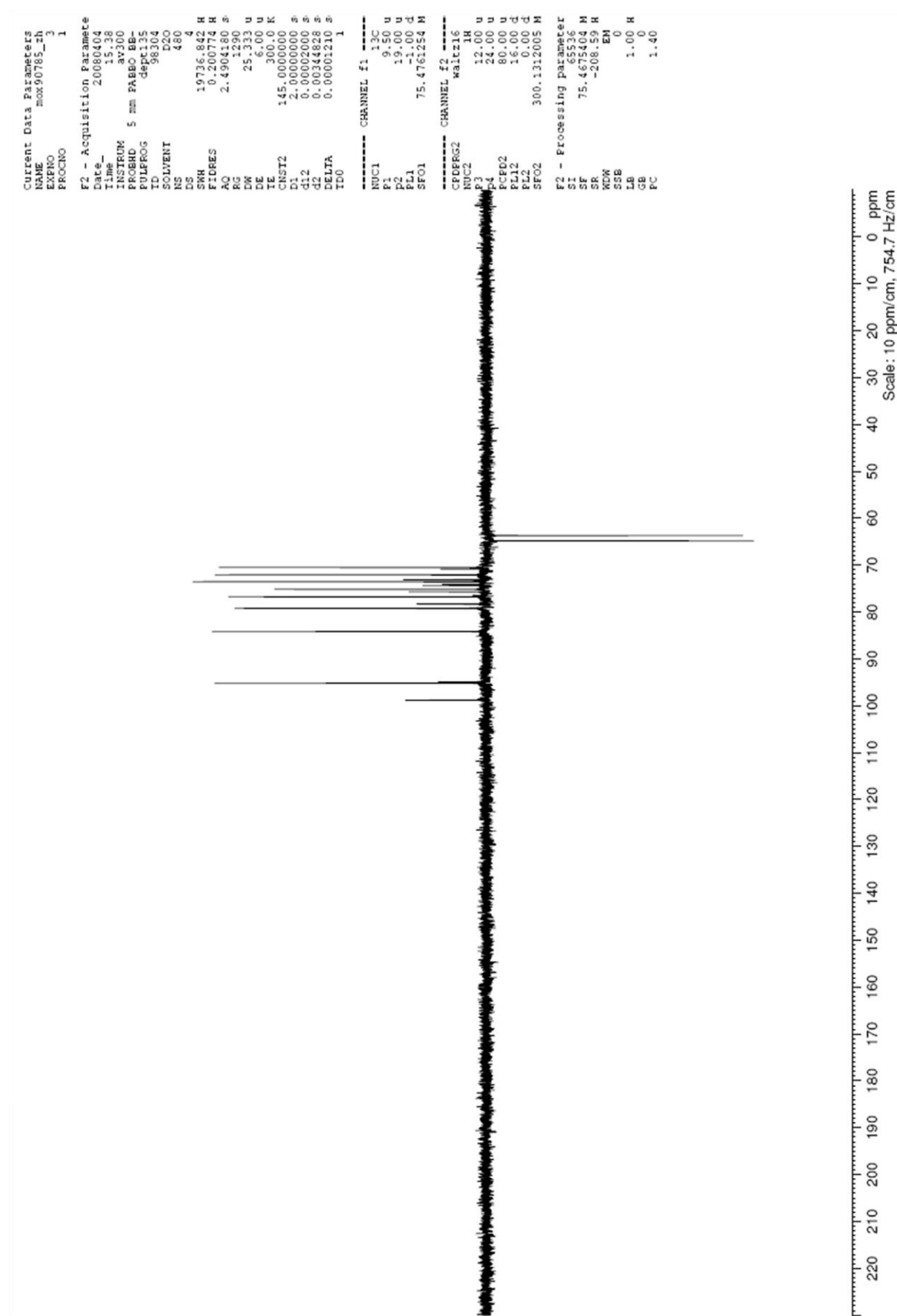
===== CHANNEL f1 =====
NUC1       13C
P1         9.50
PL1        -1.00
SFO1       75.4761254 M

===== CHANNEL f2 =====
NUC2       13C
P2         9.50
PL2        -1.00
SFO2       75.4761254 M

===== Processing parameters =====
SI         65536
SF         75.4675404 M
WDW        EM
SSB        0
GB         1.00
PC         1.40

```

Abb. 10.22 ^{13}C -CPD Chromatogramm von GalA-Fru

Abb. 10.23 ^{13}C -DEPT135 Chromatogramm von GalA-Fru

Xlt01764 #1-6 RT: 0.13-0.38 AV: 6 NL: 2.48E6
 T: **+c ESI** Full ms [49.50-1200.50]

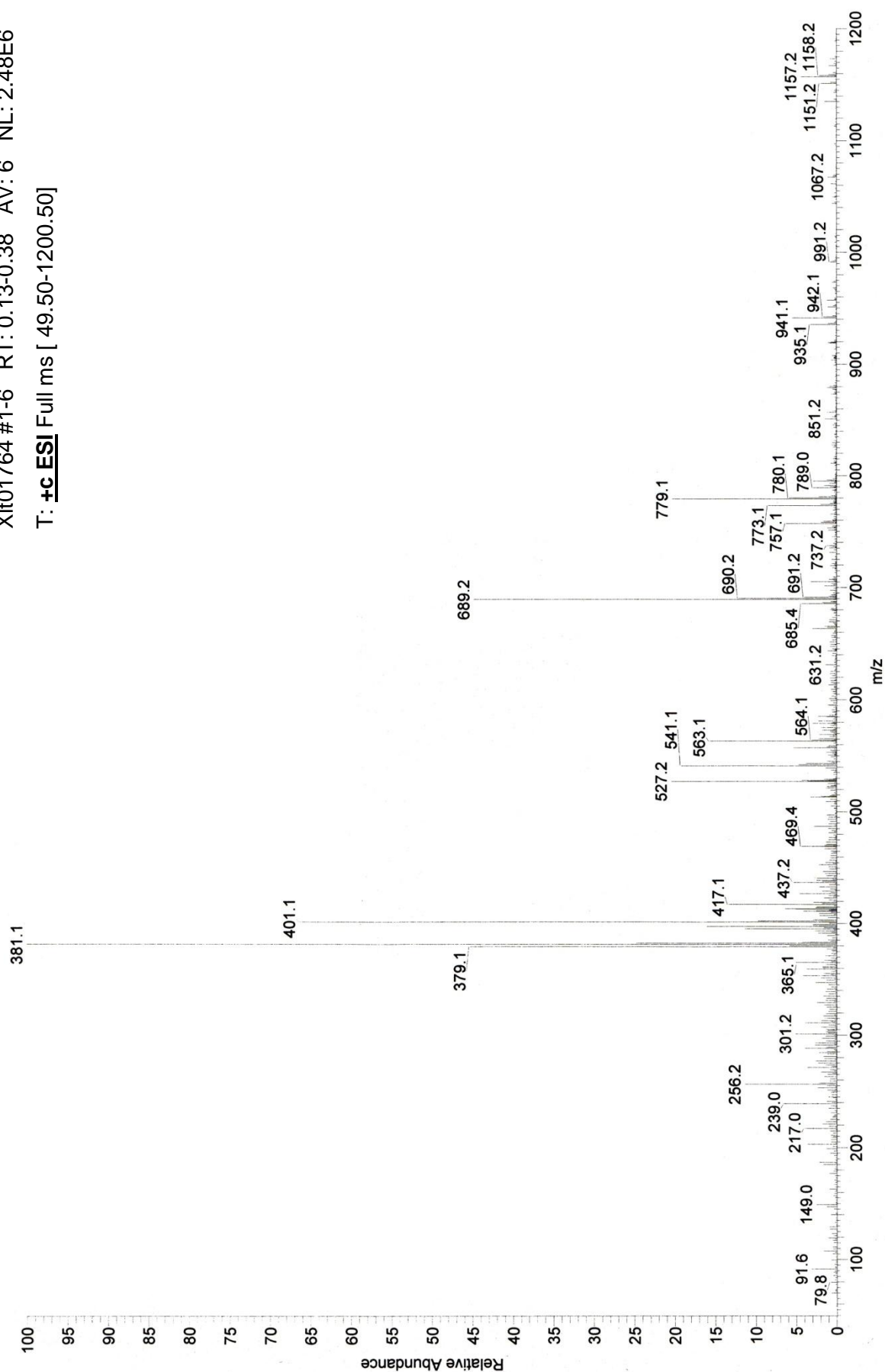


Abb. 10.24 ESI-MS von GalA-Fru (positiver Ionisierungsmodus)

Xlt01764 #12 RT: 3.93 AV: 1 NL: 2.94E7
T: **-c ESI** Full ms [49.50-1200.50]

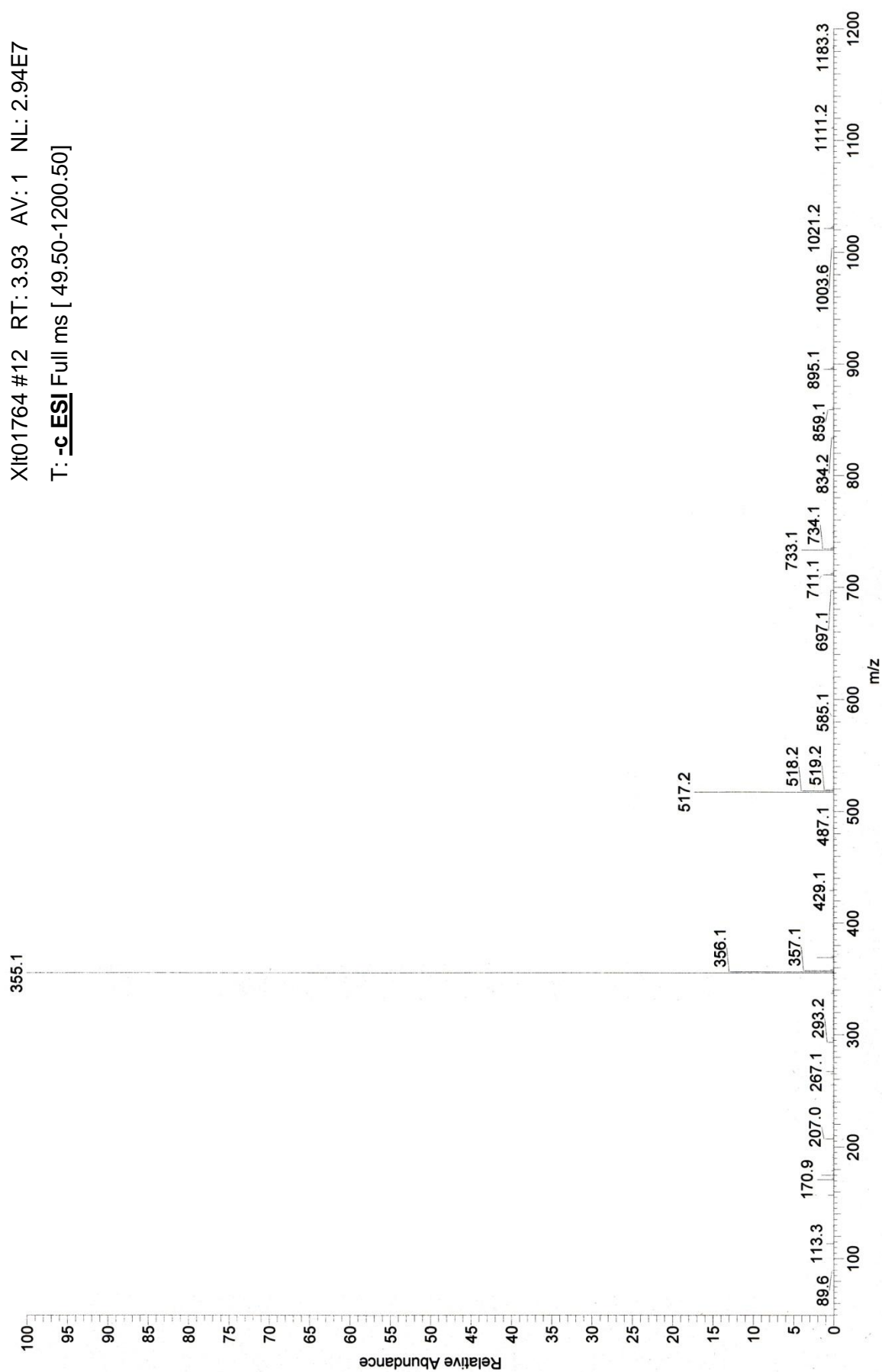


Abb. 10.25 ESI-MS von GalA-Fru (negativer Ionisierungsmodus)

10.4. Kontinuierlicher Prozess zur Produktion von neuartigen Fructooligosacchariden

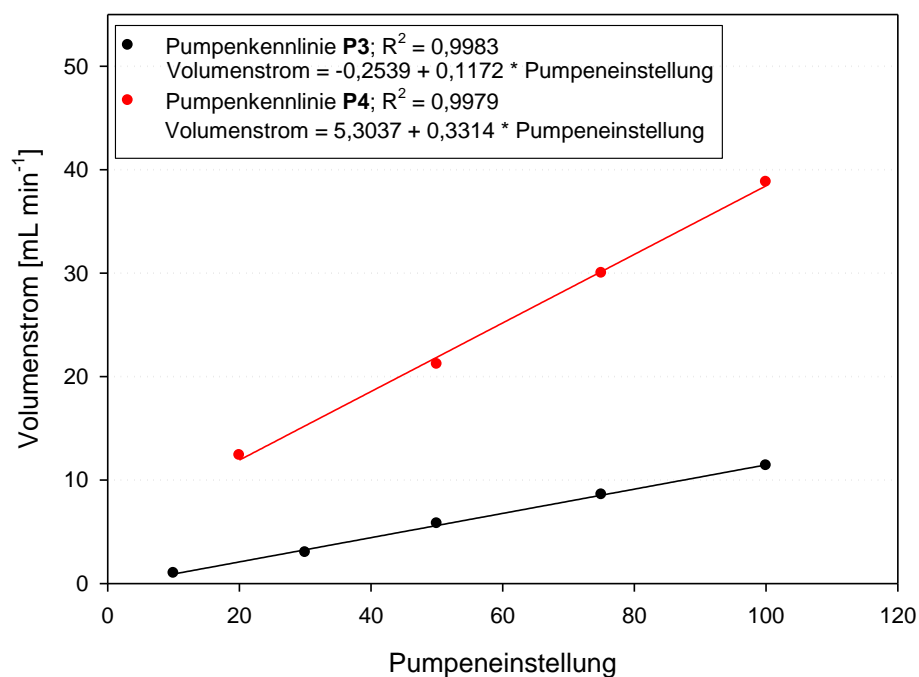


Abb. 10.26 Pumpenkennlinien der Pumpen P3 und P4

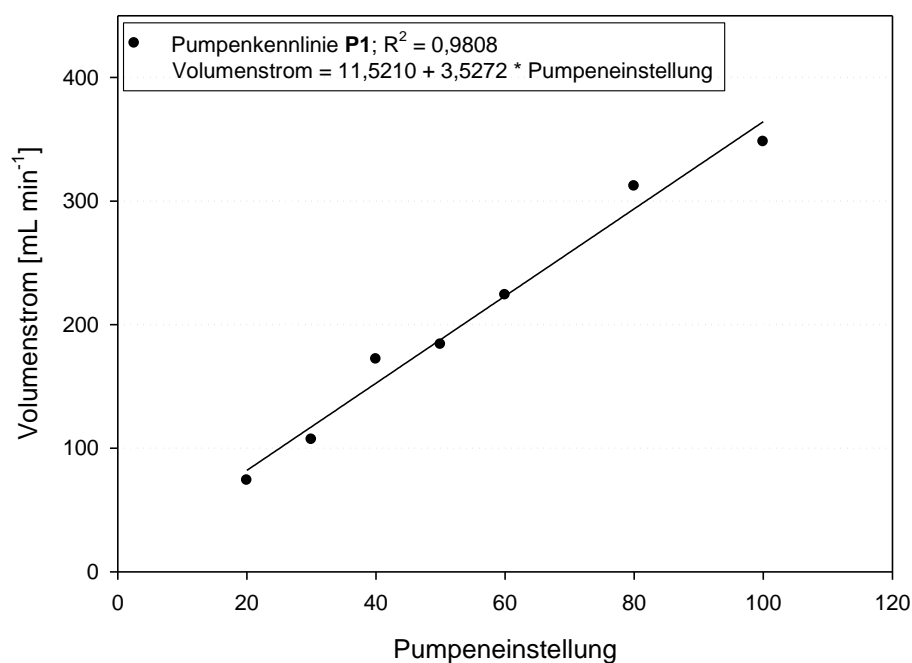


Abb. 10.27 Pumpenkennlinie der Pumpe P2